

Aus dem medizinischen Zentrum für Innere Medizin,
Schwerpunkt Gastroenterologie und Stoffwechsel

Direktor: Prof. Dr. med. T. M. Gress

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Zellbasierte Hochdurchsatzanalysen identifizieren eine
zentrale, wachstumsregulierende Rolle von Cofilin-1 im
humanen Pankreaskarzinom**



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sandra Kirchhoff geb. Melchisedech
aus Trier

Marburg, 2013

**Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 07. Mai 2013**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: PD Dr. Malte Buchholz

Korreferent: Prof. Dr. Robert Grosse

für Björn

| | |
|--|-----------|
| ZUSAMMENFASSUNG | 1 |
| SUMMARY | 2 |
| 1 EINLEITUNG..... | 3 |
| 1.1 DIE EPIDEMIOLOGIE DES PANKREASKARZINOMS..... | 3 |
| 1.2 MOLEKULARPATHOLOGISCHE GRUNDLAGEN | 4 |
| 1.3 DIE MOLEKULARGENETISCHE HOCHDURCHSATZ-ANALYSE DES PANKREASKARZINOMS | 8 |
| 1.3.1 Die Analyse der Expressionsmuster von 2000 Kandidatengenen | 8 |
| 1.3.2 Die Methode der reversen Transfektion | 9 |
| 1.4 DER KANDIDAT COFILIN-1 (CFL1) | 12 |
| 1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT | 15 |
| 2 MATERIAL..... | 16 |
| 2.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN | 16 |
| 2.2 CHEMIKALIEN..... | 18 |
| 2.3 LABORGERÄTE | 20 |
| 2.4 KONSTRUKTE UND VEKTOREN | 22 |
| 2.5 OLIGONUKLEOTIDE..... | 23 |
| 2.6 ENZYME | 24 |
| 2.7 STANDARDS | 25 |
| 2.8 KITS | 25 |
| 2.9 ANTIKÖRPER..... | 26 |
| 2.10 ZELLKULTUR | 27 |
| 2.10.1 Nährmedien und Zusätze..... | 27 |
| 2.10.2 Humane Zelllinien für die <i>in vitro</i> -Experimente | 28 |
| 3 METHODEN..... | 29 |
| 3.1 ALLGEMEINE ZELLBIOLOGISCHE METHODEN..... | 29 |
| 3.1.1 Kultivierung verschiedener Zelllinien..... | 29 |
| 3.1.2 Zellzahlbestimmung und Aussäen von Zellen | 29 |
| 3.1.3 Kryo-Konservierung | 29 |
| 3.2 PARALLELISIERTE CHARAKTERISIERUNG..... | 30 |
| 3.2.1 Herstellung der Überexpressionskonstrukte..... | 30 |
| 3.2.2 Herstellung der „Reverse Transfection“-Arrays | 33 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.2.3 | Herstellung der „Live Cell Microarrays“ | 34 |
| 3.2.4 | Transfektion der PaCaNet-Gene..... | 34 |
| 3.2.5 | Transfektion der siRNA-Library | 35 |
| 3.2.6 | Funktionelle Analysen..... | 35 |
| 3.3 | EVALUATION UND VALIDIERUNG | 37 |
| 3.3.1 | Fluoreszenzmikroskopische Auswertung | 37 |
| 3.3.2 | Validierung..... | 38 |
| 3.4 | EINZEL-CHARAKTERISIERUNG VON CFL1 | 39 |
| 3.4.1 | Molekularbiologische Methoden..... | 39 |
| 3.4.2 | Zellbiologische Methoden | 42 |
| 3.4.3 | Tierexperimentelle Untersuchungen | 48 |
| 3.4.4 | Immunologische Methoden..... | 49 |
| 3.4.5 | Statistische Auswertung..... | 53 |
| 4 | ERGEBNISSE..... | 54 |
| 4.1 | PARALLELISIERTE CHARAKTERISIERUNG..... | 54 |
| 4.1.1 | Etablierung der „Reverse Transfection“-Methode..... | 54 |
| 4.1.2 | Dokumentation der subzellulären Lokalisation | 56 |
| 4.1.3 | Funktionelle Charakterisierung der Kandidatengene mithilfe von immunzytologischen Analysen..... | 59 |
| 4.1.4 | Analyse der PaCaNet-Gene im „Forward Transfection“-Format..... | 62 |
| 4.1.5 | Validierung der reversen Transfektion | 64 |
| 4.1.6 | Die Evaluation der parallelisierten Daten führt zu 10 Kandidatengenen mit relevanten Effekten | 67 |
| 4.2 | EINZEL-CHARAKTERISIERUNG VON CFL1 | 70 |
| 4.2.1 | Auswahl eines geeigneten Kandidaten für die Einzel-Charakterisierung | 70 |
| 4.2.2 | Cofilin-1 zeigt eine gesteigerte Genexpression in pankreatischen Tumorgeweben und Zelllinien | 70 |
| 4.2.3 | Die CFL1-Überexpression mittels rekombinanter Fusionsproteine bestätigt die Ergebnisse der Hochdurchsatz-Analysen | 74 |
| 4.2.4 | Die Repression von CFL1 hemmt die Zellproliferation, ohne apoptotische Kaskaden auszulösen..... | 80 |
| 4.2.5 | Die Repression von Cofilin-1 beeinflusst das substrat-unabhängige Wachstum der Zellen | 87 |
| 4.2.6 | CFL1 hat spezifische Effekte auf das Migrationsverhalten der Karzinomzellen | 89 |
| 4.2.7 | Die induzierbaren S007-pTRIPZ-Klone zeigen <i>in vitro</i> eine hoch-signifikante Abnahme der Zellproliferation | 93 |
| 4.2.8 | <i>In vivo</i> -Experimente zeigen keine Verlangsamung des Tumorwachstums aufgrund nicht mehr nachweisbarer Repression in den S007-pTRIPZ-CFL1-Zellen..... | 95 |
| 5 | DISKUSSION..... | 100 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5.1 | DIE REVERSE TRANSFEKTION ALS ANALYSE-METHODE FÜR GENETISCHE FUNKTIONEN | 100 |
| 5.1.1 | Etablierung und Modifikation des ursprünglichen „Reverse Transfection“-Protokolls für die Analyse von Kandidatengenomen des Pankreaskarzinoms | 100 |
| 5.1.2 | Die parallelisierten Überexpressionsanalysen mittels reverser Transfektion identifizieren reproduzierbare Effekte für 19 Kandidatengene | 102 |
| 5.2 | DAS KANDIDATENGEN CFL1 | 104 |
| 5.2.1 | Die Repression von Cofilin-1 führt im Pankreaskarzinom zu einer bisher nicht beschriebenen Regulation des Zellwachstums..... | 104 |
| 5.2.2 | Cofilin ist auch im Pankreaskarzinom mit der Motilität von Tumorzellen verknüpft..... | 107 |
| 5.3 | SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK | 110 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 112 |
| 7 | ANHANG | 123 |
| 7.1 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 123 |
| 7.2 | PARALLELISIERTE CHARAKTERISIERUNG..... | 126 |
| 7.2.1 | Liste der verwendeten Überexpressionskonstrukte und siRNA-Pools und deren Sequenzen | 126 |
| 7.2.2 | Dokumentation der subzellulären Lokalisation | 137 |
| 7.2.3 | Dokumentation der funktionellen Effekte nach der Überexpression der Kandidatengene | 147 |
| 7.3 | EINZELCHARAKTERISIERUNG VON CFL1..... | 151 |
| 7.3.1 | Durchflusszytometrische Analysen | 151 |
| 7.4 | VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER | 152 |
| 7.5 | DANKSAGUNG..... | 153 |

ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund der ungünstigen Prognose des humanen duktales Adenokarzinoms des Pankreas ist es von großer Bedeutung, neue Zielgene zu identifizieren, die Ansatzstellen sowohl für neue Therapien als auch für eine frühere Diagnose bieten können.

In der hier vorgestellten Arbeit wurden deshalb insgesamt 91 potentielle Kandidatengene funktionell charakterisiert, die in vorangegangenen Hochdurchsatz-Analysen in Karzinomgeweben eine differentielle Expression aufgewiesen hatten. Für diese Untersuchung wurde die Methode der „Reverse Transfection“ in unserem Labor etabliert, um die Experimente in einem parallelisierten Microarray-Verfahren durchzuführen. Es erfolgten Überexpressions- sowie Repressionsanalysen der Kandidatengene in verschiedenen transformierten und nicht-transformierten Zelllinien, in denen die subzelluläre Lokalisation der Genprodukte sowie ihr Einfluss auf zelluläre Funktionen wie Apoptose, Proliferation oder Differenzierung analysiert wurden.

Die Evaluation dieser funktionellen Daten führte zu einer Auswahl von 10 Genen, die in den parallelisierten Experimenten reproduzierbare und auffällige Effekte zeigten.

Eines dieser Kandidaten war das Gen Cofilin-1 (CFL1), welches zur ADF/Cofilin-Familie der aktin-bindenden Proteine gehört. Die „Reverse Transfection“-Experimente zeigten für CFL1 einen Wachstums-regulierenden Effekt, der im Pankreaskarzinom bisher unbeschrieben ist. In nachfolgenden, funktionellen Detailanalysen zeigte sich eine starke Überexpression von CFL1 im Pankreaskarzinom. RNAi-basierte Inaktivierungen von CFL1 in 4 Zelllinien führten zu einem signifikanten Rückgang des Zellwachstums, während apoptotische Kaskaden unbeeinflusst blieben. Des Weiteren konnte mittels Soft-Agar-Analysen eine signifikante Verlangsamung des substrat-unabhängigen Wachstums beobachtet werden. Durchfluss-zytometrische Analysen des Zellzyklus deuten auf eine Verlangsamung der G1/S-Phasen-Transition hin.

In Migrationsanalysen konnte weiterhin eine signifikante Verlangsamung der Zellbewegungen in „Time Lapse“- und Wundheilungsexperimenten identifiziert werden, während die gerichtete Migration in Boyden-Kammer-Versuchen unbeeinflusst blieb.

Auf Basis der vorliegenden Literaturdaten stellen diese Ergebnisse den ersten Nachweis eines wachstumsregulierenden Effekts von CFL1 im Pankreaskarzinom dar.

SUMMARY

Due to the poor prognosis of the human ductal adenocarcinoma of the pancreas (PDAC) it is of major importance to identify novel target genes with high functional relevance to provide a better diagnosis or new therapeutic approaches.

In this study, 91 potential candidate genes identified as differentially expressed in carcinogenic pancreatic tissues in previous high-throughput analyses were functionally characterized. To this end, the technology of “reverse transfection” was established in our lab to perform the analyses in a highly parallelized microarray approach. Overexpression and knockdown experiments were carried out in transformed and non-transformed cell lines for all candidates to screen for subcellular localisation of the gene products and their impact on cellular functions like apoptosis, proliferation and differentiation.

Data evaluation led to the selection of 10 genes which showed significant and reproducible effects in the parallelized experiments. One of them was Cofilin-1 (CFL1), a member of the ADF/Cofilin family of actin-binding proteins. Parallelized microarray analyses revealed a previously undocumented growth-regulatory effect of this gene in pancreatic cancer. Subsequent detailed characterization demonstrated a strong overexpression of CFL1 in PDAC on mRNA as well as on protein level. RNAi-mediated knockdown of CFL1 in 4 different cell lines led to a significant inhibition of cell growth whereas apoptotic cascades were not affected. Furthermore, a significant decrease of anchorage-independent growth was observed in soft agar assays. Flow cytometric analyses indicated an attenuation of the G1 to S phase transition.

Aside from its growth-regulatory function, migration assays revealed an additional inhibitory effect of CFL1 on cell motility identified in “time lapse” and wound healing assays. In contrast to this, a directional migration analyzed in Boyden Chamber analyses remained unaffected.

Based on these data and the current state of the literature, the results of this study present for the first time a direct growth-regulatory effect of CFL1 in pancreatic cancer.

1 EINLEITUNG

In den Industriestaaten der westlichen Welt rangiert die Gesamtheit der verschiedenen Krebserkrankungen heutzutage mit jährlich steigenden Zahlen an der Spitze der häufigsten Todesursachen. Für das Jahr 2008 wurden beispielsweise weltweit 12,7 Millionen Neuerkrankungen mit ca. 7,6 Millionen Todesfällen geschätzt (Ferlay et al. 2010). Gründe für die zunehmenden Häufigkeiten der Krebskrankheiten sind neben dem steigendem Alter und dem generellen Wachstum der Bevölkerung auch ein ungesunder Lebensstil, der auf mangelnder physischer Aktivität und falscher Ernährung basiert und oftmals in der Adipositas resultiert. Auch Tabakkonsum sowie übersteigerter Alkoholgenuss können die Entstehung maligner Entitäten begünstigen (Jemal et al. 2011).

1.1 DIE EPIDEMIOLOGIE DES PANKREASKARZINOMS

Zu den tödlichsten Krebsarten der westlichen Welt zählen die Lungen- und Bronchialkarzinome, verschiedene Darm- und Magenkrebsarten sowie Mammakarzinome bei der Frau bzw. Prostatakarzinome beim Mann. Gefolgt werden diese auf Platz 4 von karzinogenen Erkrankungen des Pankreas, welche eine der schlechtesten Prognosen überhaupt aufweisen (Jemal et al. 2007). Zwar wurden für das Jahr 2011 für die Industriestaaten nur 84.200 (Männer) bzw. 80.900 (Frauen) neue Fälle von Pankreaskarzinomen geschätzt, allerdings erreichen die Sterberaten die nahezu gleichen Werte (Männer = 82.700; Frauen = 79.100) (Jemal et al. 2011). Auch in Europa führen Sterberaten von ca. 40.000 Patienten pro Geschlecht und Inzidenzen von 8 bzw. 5,4 / 100.000 Männer bzw. Frauen zu einem Ranking auf Platz 5 der tödlichsten Krebsarten (Malvezzi et al. 2012).

Histologisch betrachtet handelt es sich bei 80 % - 90 % der pankreatischen Neoplasien um duktale Adenokarzinome (engl. pancreatic ductal adenocarcinoma, Abk. PDAC). Neben diesen finden sich hauptsächlich Karzinome der Azinuszellen sowie neuroendokrine Tumore (Seufferlein et al. 2012, Hezel et al. 2006). Die Langzeit-Prognosen bei einer malignen Pankreaserkrankung sind generell sehr ungünstig. Es ergeben sich 5-Jahres-Überlebensraten von nur 5-6 % (Siegel et al. 2012). Eine Ursache für diese schlechte Prognose ist die Tatsache, dass eine Diagnose im Regelfall erst spät erfolgt. Grund hierfür sind die fehlenden und auch im

fortgeschrittenen Stadium oft uncharakteristischen Symptome wie beispielsweise Abdominal- oder Rückenschmerzen, Gewichtsverlust oder eine neu entwickelte Diabeteserkrankung. Eine akute oder chronische Pankreatitis kann dagegen ein erster deutlicher Hinweis auf eine maligne Neoplasie sein (Cascinu et al. 2010). So konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit chronischen Pankreatitiden ein deutlich höheres Risiko besitzen, an einem invasiven Pankreaskarzinom zu erkranken (Malka et al. 2002). Hinzu kommt eine starke Tendenz zur frühen Metastasierung und Invasion in umliegendes Gewebe (Loos et al. 2008). Des Weiteren weisen die meisten Tumoren des Pankreas eine ausgeprägte Resistenz gegen Radiotherapien sowie eine schlechte Ansprache auf die gängigen systemischen Behandlungen auf (Seufferlein et al. 2012). Die zurzeit einzige verfügbare kurative Therapie besteht in der radikalen Resektion des Tumorgewebes (R0-Resektion), die häufig mit einer adjuvanten Chemotherapie mit Gemcitabine (Abk. Gem) oder Fluorouracil (Abk. 5-FU) kombiniert wird und im Idealfall die 5-Jahres-Überlebensrate auf 15 - 25 % steigern kann. Allerdings sind die Tumoren bei nur 10 - 20 % der Patienten und oft nur im Frühstadium der Erkrankung operabel (Loos et al. 2008, Burris, III et al. 1997). In diesen Fällen können neoadjuvante Therapien angewandt werden, um die Tumoren im Vorfeld zu verkleinern, um dadurch eine anschließende Therapie ermöglichen zu können (Seufferlein et al. 2012).

1.2 MOLEKULARPATHOLOGISCHE GRUNDLAGEN

Obwohl die molekularbiologische Forschung im letzten Jahrzehnt auf dem Gebiet des dukalen Pankreaskarzinoms große Fortschritte verbuchen konnte, sind die Gründe für die Entstehung dieser invasiven Tumorart immer noch unklar. Kausale Zusammenhänge zwischen äußeren Einflüssen und der Erkrankung konnten beispielsweise nur für die Faktoren „Alter“ und „Tabakkonsum“ nachgewiesen werden (Hidalgo 2010). Auf Basis der bis heute gesammelten Forschungsdaten kann allerdings davon ausgegangen werden, dass das invasive duktale Pankreaskarzinom durch die Akkumulation verschiedener Genmutationen hervorgerufen wird (Li et al. 2004).

Als Ursprungsort der pankreatischen Neoplasien wird dabei der exokrine Anteil der Bauchspeicheldrüse angenommen. Dort entstehen zunächst nicht-invasive Vorläufer-Läsionen, die so genannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (Abk. PanINs), bei denen es sich um prä maligne Läsionen handelt, die sich zum invasiven

Pankreaskarzinom entwickeln können (Hruban et al. 2000). Zwar kommen diese PanIN-Läsionen auch im gesunden Pankreasgewebe vor, allerdings konnte von Andea und Kollegen (2003) nachgewiesen werden, dass ihre Anzahl und der Grad der Veränderung im malignen Pankreasgewebe im Vergleich zum gesunden Organ signifikant ansteigt. Die Läsionen können in die 3 verschiedenen Stadien PanIN-1a & -1b, 2 und 3 eingeteilt werden, wobei Stadium 1 nur eine minimale Dysplasie des Epithelgewebes aufweist, welche in den beiden Folgestadien an Komplexität stetig zunimmt und letztlich in einem invasiven Karzinomgewebe endet (Hruban et al. 2007) (vgl. auch Abb. 1, s. Folgeseite).

Während diese PanIN-Läsionen mit nahezu allen Adenokarzinomen des Pankreas einhergehen, existieren noch zwei weitere Arten der nicht-invasiven Neoplasien. Diese werden klassifiziert als die Gruppe der intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien (Abk. IPMNs) und die der muzinös-zystischen Neoplasien (Abk. MCNs), die allerdings seltener vorkommen als die PanIN-Läsionen (Hruban et al. 2008, Brugge et al. 2004).

Wie bereits erwähnt gilt es zum heutigen Zeitpunkt als gesichert, dass es sich bei Pankreaskarzinomen um eine Krankheit mit genetisch basiertem Hintergrund handelt (Li et al. 2004, Maitra & Hruban 2008). Die Entwicklung des invasiven Karzinoms aus den prämaligen Läsionen geht einher mit verschiedenen somatischen Genmutationen in den Epithelzellen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Karzinogenese auftreten (Hidalgo 2010, Li et al. 2004). Es zeigt sich, dass nahezu alle Patienten mit einer malignen Pankreaserkrankung eine oder mehrere der folgenden vier Mutationen aufweisen (Maitra & Hruban 2008). Die als erstes beobachtete spezifische Genveränderung im Pankreaskarzinom ist eine aktivierende Mutation des K-ras-Onkogens (Almoguera et al. 1988, Maitra et al. 2005). Diese tritt zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Karzinogenese bereits in PanIN-I-Läsionen auf und ist mit Häufigkeiten von 80-90% bei fast allen Erkrankten nachzuweisen (Almoguera et al. 1988, Caldas & Kern 1995, Moskaluk et al. 1997). Dieses Onkogen ist über den MAPK/AKT-Signalweg an der Regulation des Zellzyklus beteiligt, wodurch seine konstitutive Aktivierung in einem gesteigerten Zellwachstum und verbessertem Zellüberleben resultiert (Tuveson et al. 2004, Hidalgo 2010).

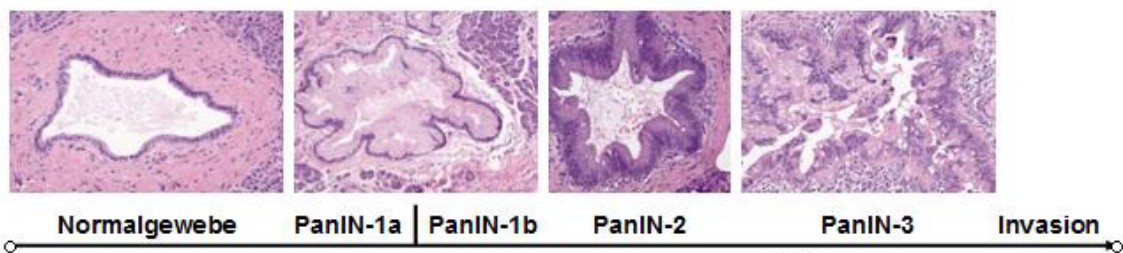
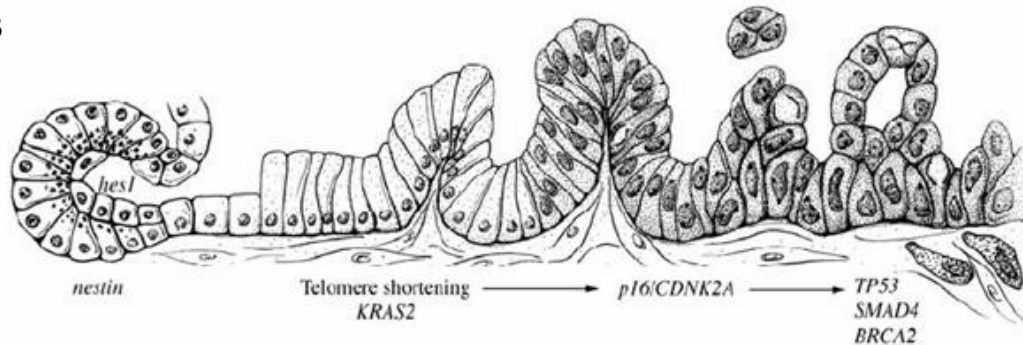
A**B**

Abbildung 1: Entstehung eines invasiven Adenokarzinoms aus gesundem Pankreasgewebe über die Vorläufer-Läsionen PanIN 1-3. A: Histologische Präparationen von Normalgewebe und den verschiedenen Stadien 1-3 der pankreatischen, intraepithelialen Neoplasien (PanINs) (von links nach rechts). Über den Verlauf zeigen sich sowohl strukturelle als auch zelluläre Veränderungen. **B:** Schematisches Modell der histologischen Veränderungen von Normalgewebe zum invasiven Tumorgewebe. Außerdem werden die genetischen Mutationen und ihr zeitliches Erscheinen im Pankreaskarzinom dargestellt. Darstellung mit freundlicher Genehmigung aus Hruban et al. 2007.

Neben dieser K-ras-Mutation weisen nahezu alle Patienten weitere Veränderungen in Tumor-Suppressor-Genen auf. So erfolgt sehr häufig eine inaktivierende Mutation des Gens CDKN2A/INK4 (Caldas et al. 1994). Dieses kodiert für das Zellzyklus-Protein p16, welches für die G1/S-Phasen-Transition verantwortlich ist. Eine Hemmung dieses Gens führt daher durch einen verhinderten Zellzyklus-Arrest ebenfalls zu einem gesteigerten Zellwachstum (Liggett, Jr. & Sidransky 1998, Hidalgo 2010). Die Mutation tritt in fast 95 % aller Karzinomfälle auf und erfolgt ebenfalls im Frühstadium der malignen Transformation (Schutte et al. 1997, Hustinx et al. 2005, Sipos et al. 2009). Neben diesen beiden, sehr häufigen Mutationen können auch die Tumor-Suppressoren TP53 und DPC4/SMAD4 betroffen sein, die allerdings beide erst in späteren Stadien der Karzinogenese auftreten (Li et al. 2004). TP53 ist in 50 - 75 % der Fälle von einer inaktivierenden Mutation betroffen, wodurch die betroffenen Zellen in der Lage sind, die zellulären DNA-Reperatur-Mechanismen zu umgehen und somit apoptotische Signale in den Tumorzellen verhindert werden können (Redston et al. 1994, Maitra & Hruban 2008). Mit einer Frequenz von 50 % zählt auch SMAD4 noch zu den am häufigsten mutierten Genen im Pankreaskarzinom (Hahn et al. 1996). Dieses Gen ist in den

TGF β -Signalweg involviert, der im Normalfall einen wachstumshemmenden Effekt auf die Zellen ausübt. Im Falle des inaktiven SMAD4-Proteins erhalten die Zellen dagegen einen Wachstumsvorteil (Ozawa et al. 2001).

Zusätzlich zu diesen gut untersuchten Mutationen der Pankreaskarzinomzellen konnten auch Veränderungen in Bezug auf verschiedene Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren nachgewiesen werden (Sakorafas et al. 2000). Davon betroffen ist zum Beispiel der bereits erwähnte „transforming growth factor β “ (Abk. TGF β), der unter anderem für die Regulation von Zellwachstum und -differenzierung verantwortlich ist (Goggins et al. 1998). Durch Mutationen dieses Wachstumsfaktors werden in den Zellen Signalwege so verändert, dass die Zellen einen zusätzlichen Überlebens- und Wachstumsvorteil erhalten. Des Weiteren wird durch diese Veränderungen die Entwicklung von invasiven und metastasierenden Phänotypen ermöglicht. Auch die Resistenz gegen die üblichen Chemotherapeutika wird mit diesen Mutationen in Zusammenhang gebracht (Li et al. 2004).

Ein weiteres Charakteristikum des invasiven Pankreaskarzinoms ist eine ausgeprägte desmoplastische Stromareaktion (Neesse et al. 2011, Erkan et al. 2008). Der Begriff Stroma bezeichnet dabei das extrazelluläre und zelluläre Geflecht, welches die eigentlichen Tumorzellen umgibt und mit ihnen interagiert (Chu et al. 2007). Die Bildung dieses Stromas beruht auf der komplexen Interaktion zwischen malignen Tumorzellen, non-neoplastischen Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten und Entzündungszellen, sowie der extrazellulären Matrix (engl. extracellular matrix, Abk. ECM) (Chu et al. 2007, Mahadevan & Von Hoff 2007). Die desmoplastische Reaktion bezeichnet die Proliferation des fibrotischen Gewebes, dessen veränderte ECM sowohl das Tumorstromawachstum als auch die Invasion und Metastasierung in die umliegenden Gewebe fördert (Mahadevan & Von Hoff 2007). Des Weiteren exprimieren die Stromazellen verschiedenste Proteine, die mit einer schlechten Prognose assoziiert werden sowie die bereits beschriebene Resistenz gegen die Behandlung mit Chemotherapeutika begünstigen (Hidalgo 2010). Demnach hängt die schlechte Ansprache auf zytostatische Medikamente unter anderem damit zusammen, dass durch das kompakte Stromagewebe die Vaskularisierung der Pankreastumore schlecht ausgeprägt ist (Olive et al. 2009). Dadurch können die sehr kurzlebigen Zytostatika wie beispielsweise Gemcitabine in nicht ausreichendem Maße in die direkte Umgebung der Tumorzellen gelangen, wodurch eine deutliche Verlangsamung des Tumorstromawachstums

durch eine adjuvante Therapie nur selten beobachtet werden kann (Neesse et al. 2011, Olive et al. 2009).

1.3 DIE MOLEKULARGENETISCHE HOCHDURCHSATZ-ANALYSE DES PANKREASKARZINOMS

Um die generell schlechten Diagnose- und Therapiemöglichkeiten im Falle eines Pankreaskarzinoms zu verbessern, ist es wichtig, die Funktionen der beteiligten Gene zu verstehen, um die genetischen Grundlagen dieser Krankheit aufklären zu können. Diese Analysen der zellulären Funktionen und ihrer Auswirkungen auf die unterschiedlichen Signalwege sind dabei nicht nur langwierig, sondern oft auch ergebnislos. Aufgrund dessen ist eine adäquate Vorauswahl der zu untersuchenden Gene von großer Bedeutung.

1.3.1 Die Analyse der Expressionsmuster von 2000 Kandidatengenen

Das erste genetische Expressionsprofil eines humanen Pankreaskarzinoms wurde mithilfe einer frühen Form von Microarrays und differentiellen Hybridisierungen erstellt (sog. Raster-Arrays, engl. gridded arrays) (Gress et al. 1996). Die sich stetig weiterentwickelnde Microarray-Technologie, die Entschlüsselung des menschlichen Genoms und die damit verbundene Entwicklung des „whole genome sequencing“ eröffnete im Folgenden die Möglichkeit für zahlreiche weitere Expressions-Analysen, wodurch die gewonnenen Informationen kontinuierlich erweitert wurden (Crnogorac-Jurcevic et al. 2001, Iacobuzio-Donahue et al. 2003, Han et al. 2002, Logsdon et al. 2003, Geng et al. 1999, Gress et al. 1997, Lu et al. 2004, Lander et al. 2001, Venter et al. 2001). Solche Genom-Analysen generieren jedoch eine Flut von potentiell interessanten Expressionsdaten, die erst einer ausgiebigen Analyse bedürfen, bevor sie einen konkreten Ansatzpunkt für die klinische Forschung bieten (Iacobuzio-Donahue et al. 2003). Da sie in der Regel sehr kostenintensiv sind und die ermittelten Daten nicht unmittelbar Aufschluss über die molekularen Funktionen der einzelnen Gene geben, haben die so ermittelten Expressionsprofile eher selten einen direkten Nutzen für die Diagnostik und Therapie des Pankreaskarzinoms.

Aufgrund dessen wurden für die weiteren Hochdurchsatz-Analysen unserer Arbeitsgruppe spezialisierte cDNA-Arrays verwendet, mit denen die Expressionsmuster

von ausgewählten Genkohorten analysiert werden konnten, was sowohl die Komplexität als auch die Kosten dieser Analysen reduzierte (Buchholz et al. 2005, Fensterer et al. 2004). Für diese Art von Microarrays erfolgt die Hybridisierung des Probenmaterials mit cDNA-Klonen und die anschließende Erstellung der Expressionsmuster (Skena et al. 1995, Duggan et al. 1999).

Für die Identifizierung von Genen mit potentiell starker funktioneller Relevanz im Pankreaskarzinom wurde zunächst ein Kollektiv aus ca. 2000 Kandidatengenen zusammengestellt, die zum einen bereits Bestandteil vorangegangener Studien gewesen waren (vgl. Gress et al. 1996, Fensterer et al. 2004), und zum anderen aus relevanten Genfamilien stammten (Kinasen, Proteasen, Transkriptionsfaktoren, u. a.). Neben humanem malignem sowie nicht-malignem Pankreasgewebe, sowie Xenograft-Geweben wurden auch funktionelle Zellkulturmodelle herangezogen, die die grundlegenden Tumoreigenschaften wie Metastasierung, Invasion oder Apoptose-Resistenz modellieren. Nach Generierung der zahlreichen Expressionsprofile konnte der gewonnene Datensatz mittels bioinformatischer Analysen bezüglich verschiedenster funktioneller Fragestellungen analysiert werden. Somit konnten nicht nur diagnostisch verwendbare Unterschiede zwischen malignen und nicht-malignen Gewebearten aufgedeckt werden, sondern auch Rückschlüsse gezogen werden, in wie weit die verschiedenen Gene an den funktionellen Aspekten der Tumorprogression beteiligt sein könnten. Letztendlich wurde durch diese Hochdurchsatz-Analyse ein Kollektiv von 79 Kandidatengenen zusammengestellt, bei denen eine funktionelle Bedeutung im Pankreaskarzinom für wahrscheinlich angesehen werden konnte (persönliche Kommunikation M. Buchholz).

Diese 79 Kandidatengene sollten nun im Zuge der hier vorgelegten Arbeit in einem parallelisierten Verfahren bezüglich ihrer zellulären Funktionen charakterisiert werden. Um dieses Vorhaben zu realisieren, wurde die Methode der reversen Transfektion in unserem Labor etabliert, die im folgenden Kapitel näher erläutert werden soll.

1.3.2 Die Methode der reversen Transfektion

In der Regel werden zur Einzelanalyse eines Gens Überexpressions- und Repressionsstudien durchgeführt, in denen durch eigenständige Assays die verschiedenen Zellfunktionen aufgedeckt werden können. Diese Herangehensweise ist allerdings sowohl zeitaufwändig als auch kostenintensiv und für die Gesamtheit aller Gene eines Microarrays nicht durchführbar (Ziauddin & Sabatini 2001).

Um dieses Problem zu lösen, haben Ziauddin und Sabatini (2001) die „Reverse Transfection“-Technologie entwickelt, mit denen die funktionellen Aspekte einer Vielzahl von Genen in einem parallelisierten Ansatz untersucht werden können. Die Methode erhielt ihren Namen, da hier das Protokoll einer gängigen Lipid-Transfektion in ihrer Abfolge umgekehrt (engl. reverse) wird.

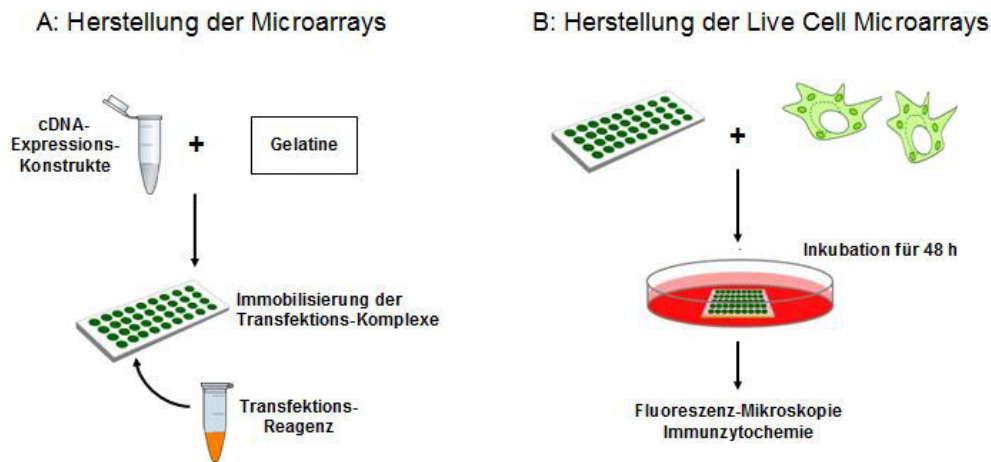


Abbildung 2: Schematischer Ablauf der „Reverse Transfection“-Methode. **A:** cDNA-Expressionskonstrukte werden zur Stabilisation mit einer Gelatine-Lösung vermischt. Die so gebildeten Komplexe werden auf Glas-Objektträgern immobilisiert und getrocknet. Anschließend werden die Objektträger mit einem Transfektions-Reagenz überschichtet. **B:** Die in **A** generierten Microarrays werden in der Zellkultur mit verschiedenen Zelllinien übersät und inkubiert. Die Zellen siedeln sich direkt auf den Transfektionskomplexen an und nehmen diese auf. Nach einer Inkubationszeit von 48 h werden die Zellen auf den Objektträgern fixiert. Die so generierten „Live Cell Microarrays“ können im Anschluss immunzytologisch behandelt und fluoreszenz-mikroskopisch ausgewertet werden (Abbildung modifiziert nach Ziauddin und Sabatini 2001).

Dazu werden cDNA-Expressionsklone in einer Gelatinelösung auf Glasobjektträgern immobilisiert und dort mit einem Transfektionsreagenz in Kontakt gebracht. Auf dem Objektträger bilden sich Transfektionskomplexe im Microarray-Format, wobei sich an jeder Position ein anderer cDNA-Klon befindet. Diese Microarrays werden anschließend in der Zellkultur mit den zu untersuchenden Zellen übersät. Immer dort, wo sich diese direkt auf den Transfektionskomplexen ansiedeln, erfolgen eine Aufnahme und die damit verbundene Überexpression des entsprechenden Gens in den Zellen. Man erhält ein Array aus transfizierten Zellen in einem Zellrasen aus untransfizierten Zellen (sog. „Live Cell Microarray“), das für weitere Untersuchungen der zellulären Phänotypen zur Verfügung steht (vgl. Abb. 2; für eine detaillierte Methodenbeschreibung vgl. Ziauddin and Sabatini 2001).

Die Technik der reversen Transfektion wurde in den folgenden Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen für die funktionelle Genanalyse verwendet und dabei stetig weiterentwickelt. Im ursprünglichen Protokoll wurden die Expressionsklone gemeinsam mit einem GFP-Konstrukt co-transfiziert, um ein Auffinden der einzelnen Arraypositionen zu erleichtern. Durch eine nachfolgende Antikörper-Behandlung der Zellen konnten die mit den cDNA-Konstrukten transfizierten Zellen ermittelt werden und ein Phänotypen-Vergleich mit den untransfizierten Zellen stattfinden (Ziauddin & Sabatini 2001).

Über ein modifiziertes Verfahren wurden in Folgestudien nicht nur die Microarray-Positionen, sondern die Genprodukte selbst markiert (Conrad et al. 2004). Dazu wurden die zu untersuchenden cDNA-Klone mit dem fluoreszierenden Fusionsprotein eGFP (GFP = engl. enhanced green fluorescing protein) oder dessen Derivat eYFP (engl. enhanced yellow fluorescing protein) gekoppelt (Conrad et al. 2004). Durch diese Kombination wurde die Phänotypen-Analyse der Microarrays weiter vereinfacht, da mit dieser Methode ein Auffinden der eigentlichen Genprodukte innerhalb der Zellen erfolgen konnte und somit auch die subzellulären Lokalisationen für die Analyse zugänglich waren (Conrad et al. 2004). Diese direkte Fusion ist auf eine Publikation von Simpson et al. (2000) zurückzuführen. In dieser wird die Fusion mit dem YFP-Konstrukt sowie einem weiteren Derivat, dem cyan-fluoreszierenden Protein (Abk. CFP), gegenüber dem GFP-Konstrukt als vorteilhaft beschrieben, da hier 2 unterschiedliche Vergleichskonstrukte generiert werden, deren Ergebnisse miteinander verglichen werden können. Dadurch können möglicherweise auftretende Artefakte besser identifiziert werden.

Auch andere Arbeitsgruppen griffen die Methode der „Reverse Transfection“ auf. In den Jahren 2003 und 2004 wurde die Methode auf die RNAi-Technologie ausgeweitet, indem Zell-Microarrays zum einen aus siRNA- (Kumar et al. 2003), zum anderen aus shRNA-Konstrukten (Silva et al. 2004) erstellt wurde. Des Weiteren erfolgte mithilfe der reversen Methode unter anderem die Analyse von am MAPK-Signalweg (Webb et al. 2003) oder an Apoptoseprozessen (Mannherz et al. 2006) beteiligter Genen.

Da es sich bei den „Reverse Transfection“-Microarrays um eine zellbasierte Analysemethode handelt, sind gängige immunzytologischen Anwendungen, wie z. B. eine DAPI-Färbung der Zellkerne oder Antikörper-gestützte Wachstums- und Zelltodanalysen leicht auf die Arrays übertragbar (Mannherz et al. 2006). Aus diesem Grund wurde die Technologie in der hier vorliegenden Arbeit verwendet, um die 79

vorausgewählten Kandidatengene des Pankreaskarzinoms in einem parallelisierten Ansatz funktionell zu charakterisieren (vgl. Kap. 1.3.1). Ziel dieser Analyse war die Identifikation solcher Kandidatengene, die das größte Potential aufweisen, als zukünftige Zielgene für diagnostische oder therapeutische Ansätze zu dienen.

1.4 DER KANDIDAT COFILIN-1 (CFL1)

Eines der Gene, die in den parallelisierten Hochdurchsatzanalysen signifikante und reproduzierbare Effekte zeigten, war das Protein Cofilin-1 (CFL1), welches zur ADF/Cofilin-Familie der aktin-bindenden Proteine gehört. Diese kleinen, 3-dimensional gefalteten Proteine (13 - 21 kDa) kommen ubiquitär in allen Vertretern des eukaryotischen Reiches vor, d. h. sowohl in Tieren und Pflanzen als auch in Pilzen und Hefen (van Troys et al. 2008, Bamburg 1999, Maciver & Hussey 2002, Pollard et al. 2000). Säugetiere weisen 3 verschiedene aktin-bindende Proteine auf, die bereits in den 1980er Jahren entdeckt wurden (Van Troys et al. 2008). Neben Cofilin-1, dem nicht-muskulären Cofilin (Abk. CFL1, auch n-cofilin), findet sich noch das muskuläre Cofilin-2 (Abk. CFL2, auch m-cofilin) sowie der aktin-depolymerisierende Faktor (Abk. ADF, auch Destrin) (Bamburg 1999, Maekawa et al. 1984, Nishida et al. 1984a, Ono et al. 1994, Nishida et al. 1984b, Maciver & Hussey 2002). Es zeigt sich dabei innerhalb einer Spezies für die Proteine ADF und Cofilin-1 eine Sequenzhomologie der Aminosäuren von bis zu 70 % (Bamburg & Bernstein 2008).

Die Expressionsmuster dieser drei Proteine in Säugetieren unterscheiden sich in Abhängigkeit der analysierten Zell- und Gewebearten (Gurniak et al. 2005, Vartiainen et al. 2002, Yonezawa et al. 1987). Außerdem spielt das Entwicklungsstadium eine Rolle. Beispielsweise stellt Cofilin-1 die vorherrschende Isoform im Embryonalstadium dar (van Troys et al. 2008). Im adulten Organismus gleichen sich die Expressionsmuster der Isoformen CFL1 und ADF dagegen an (van Troys et al. 2008). Des Weiteren wird CFL1 im adulten Muskelgewebe durch das muskuläre CFL2 ersetzt, welches dann die vorherrschende Isoform in diesen Geweben darstellt (Nakashima et al. 2005, Ono et al. 1994).

Es ist bekannt, dass die Proteine der ADF/Cofilin-Familie funktionell für die Dynamik der Aktinregulation verantwortlich sind (Bernstein & Bamburg 2010). Sie können an Aktinmoleküle binden und sind deshalb essentiell für alle zellulären Vorgänge, an

denen das Aktinzytoskelett beteiligt ist (Maciver & Hussey 2002). Das Zytoskelett besteht aus Aktinmolekülen, die in einer systematischen Anordnung miteinander verflochten sind (Chhabra & Higgs 2007). In den Zellen kommen zwei verschiedene Aktinformen vor. So existieren Aktin-Monomere (auch globuläres Aktin, G-Aktin), die sich in den Zellen zu 2-strängigen Polymeren zusammenlagern, die helixartig umeinander gewunden sind (dos Remedios et al. 2003, Mogilner & Edelstein-Keshet 2002, Pollard & Borisy 2003). Die so gebildeten Aktinketten werden als Aktinfilamente oder filamentöses Aktin (Abk. F-Aktin) bezeichnet, die Entstehung neuer Aktinfilamente als Nukleation (vgl. Abb. 3) (Chhabra & Higgs 2007, Mogilner & Edelstein-Keshet 2002).

Die Gesamtheit der Aktinfilamente bildet das Aktinzytoskelett der eukaryotischen Zellen. Dieses weist eine starke Dynamik in seiner Zusammensetzung auf, die von den aktin-bindenden Proteinen beeinflusst wird (dos Remedios et al. 2003). Es erfolgt dafür beispielsweise ein Abbau bestehender Aktinfilamente, um den Pool an verfügbarem G-Aktin zu vergrößern (Bamburg 1999, Carlier et al. 1999, Pavlov et al. 2007). Gleichzeitig können die Proteine auch die Neubildung der Filamente begünstigen (Pavlov et al. 2007). Dadurch wird innerhalb der Zellen ein schneller Umbau des Aktin-Zytoskeletts ermöglicht, wie er beispielsweise für die Zellmotilität oder Zellteilung benötigt wird (Ono 2003, Pollard 2007, Yeoh et al. 2002).

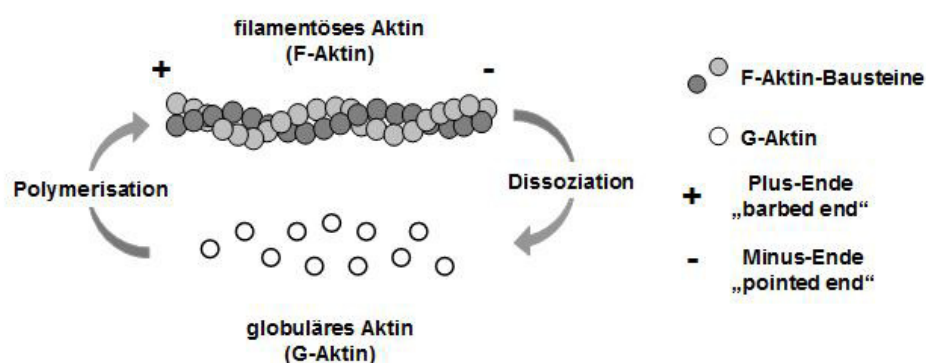


Abbildung 3: Modell eines Aktinfilaments (modifiziert nach van Troys et al. 2008). Aktinfilamente (filamentöses Aktin, F-Aktin) entstehen innerhalb der Zellen aus globulären Aktin-Monomeren (G-Aktin). Die Monomere lagern sich zu 2 Polymerketten zusammen, die sich dann helixartig umeinander winden. Dieser Vorgang wird als Polymerisation bezeichnet. Jedes Aktinfilament besitzt ein Plus-Ende (engl. barbed end), sowie ein Minus-Ende (engl. pointed end). Der Anbau des G-Aktins erfolgt vorwiegend am Plus-Ende, die Dissoziation in der Regel am Minus-Ende.

Aufgrund dessen sind die ADF/Cofilin-Proteine in zytosolischen Bereichen mit einer hohen Fluktuation der Aktinfilamente lokalisiert (Bamburg & Bray 1987, Maciver & Hussey 2002). Zwar weisen die Proteine zusätzlich eine nukleäre Lokalisations-Sequenz auf, die es ihnen in Einzelfällen ermöglicht, gemeinsam mit den gebundenen Aktinfilamenten in den Zellkern überzusiedeln, allerdings wird dies vorrangig unter zellulären Stressbedingungen beobachtet (Bernstein & Bamburg 2010, Bamburg et al. 1999, Nishida et al. 1987).

Die höchsten Konzentrationen werden allerdings im Leitsaum (engl. leading edge) migrierender Zellen sowie in der Region des kontraktilen Rings sich teilender Zellen festgestellt (Yonezawa et al. 1987, Nagaoka et al. 1995). Anhand einer Cofilin-Überexpression wurde etwa gezeigt, dass die Cofilin-abhängige, schnelle Um- bzw. Neubildung der Filamente die zelluläre Migration von Glia- und Melanomzellen fördert (Dang et al. 2006, Yap et al. 2005). Des Weiteren wurde anhand von Ratten- und Mausmodellen des Mammakarzinoms aufgedeckt, dass eine Repression des Cofilins zu einer gehemmten Zellbewegung führt (Wang et al. 2006, Wang et al. 2007). Zuletzt beschreibt eine der aktuellsten Publikationen auf diesem Gebiet einen Zusammenhang zwischen einem reprimierten Cofilin-Status im pulmonalen Adenokarzinom und einem vermindertem Metastasierungspotential, welches in einer gesteigerten Überlebensrate resultiert (Peng et al. 2011).

Zusätzlich dazu wurde anhand verschiedener Modellorganismen ein essentieller Einfluss von Cofilin-1 für eine korrekte Zellteilung ermittelt. Es wurden unter anderem Studien an *Saccharomyces cerevisiae* (Iida et al. 1993, Moon et al. 1993), *Caenorhabditis elegans* (McKim et al. 1994), *Drosophila melanogaster* (Gunsalus et al. 1995) und *Xenopus laevis* (Abe et al. 1996) durchgeführt, in denen übereinstimmend dargestellt werden konnte, dass Mutationen der homologen Cofilin-Gene in den unterschiedlichen Organismen zu einer gestörten Zellteilung führen (für einen Überblick siehe Bamburg 1999a). Vor allem auf Basis der Studien an *D. melanogaster* und *X. laevis* geht man heute davon aus, dass ein inaktives Cofilin-Protein zu einer nicht vollendeten Chromosomen-Separation in der Anaphase und einem unvollständigen Abbau der Teilungsfurche in der Telophase führt (Gunsalus et al. 1995).

1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Wie anhand der verschiedenen Statistiken belegt ist, handelt es sich bei den duktaalen Adenokarzinomen des Pankreas um eine der tödlichsten und am schlechtesten behandelbaren Krebserkrankungen weltweit. Eine kurative Therapie ist zurzeit nur in Einzelfällen möglich, was in den schlechten diagnostischen Möglichkeiten und der äußerst ausgeprägten Chemoresistenz von Pankreaskarzinomen begründet liegt.

Hochdurchsatz-Analysen der vergangenen Jahre lieferten zwar umfangreiche Informationen über die differenzielle Expression von potenziellen Zielgenen im Pankreaskarzinom, allerdings ließen diese keine Rückschlüsse auf die eigentlichen zellulären Funktionen dieser Kandidaten zu.

Die von Ziauddin und Sabatini entwickelte Methode der reversen Transfektion bot eine zeit- und kostensparende Möglichkeit, diese funktionellen Daten für ein Kollektiv an Kandidatengenen in einem parallelisierten Ansatz zu liefern. Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb die Etablierung dieser Methodik in unserem Labor, um sie auf das Modellsystem des duktaalen Adenokarzinoms anzuwenden und einen Datensatz zu generieren, der Informationen über die subzellulären Lokalisationen der Genprodukte als auch deren Effekte auf Proliferation, Apoptose und Differenzierung beinhaltet.

Der gewonnene Datensatz sollte anschließend zur Evaluation herangezogen werden, um solche Gene aus dem Kollektiv herauszufiltern, die mit hoher Wahrscheinlichkeit das Potential besitzen, einen Ansatzpunkt für neue diagnostische und therapeutische Maßnahmen darzustellen. Diese Kandidaten sollten in folgenden Einzel-Analysen im Detail charakterisiert werden. Ziel war es dabei, bisher unbekannte regulatorische Funktionen in Bezug auf das Pankreaskarzinom aufzudecken und sie in Zusammenhang mit bekannten Mechanismen und Signalwegen zu bringen, um ihre klinische Relevanz zu ermitteln.

2 MATERIAL

2.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Tabelle 1: verwendete Materialien

| Material | Hersteller |
|--|--|
| 96-Loch-Zellkulturplatte, U-Boden | Greiner bio-one (Frickenhausen) |
| Combitips plus / 2,5 ml Combitips biopur 5 ml | Eppendorf (Hamburg) |
| Cryoröhrchen 2 ml | Greiner bio-one (Frickenhausen) |
| Deckgläser | Menzel-Gläser (Braunschweig) |
| Einwegnadeln & -spritzen | B. Braun (Melsungen) |
| Einwegpipetten 2 ml 5 ml 50 ml | Greiner bio-one (Frickenhausen) |
| Einwegpipetten 10 ml 25 ml | Sarstedt (Nürnbrecht) |
| Gewebekulturflasche T-175 | Sarstedt (Nürnbrecht) |
| Gewebekulturflasche 25 mm ² 75 mm ² | Greiner bio-one (Frickenhausen) |
| Gewebekulturplatten 6-Loch | Sarstedt (Nürnbrecht) |
| Gewebekulturplatten 12-Loch 24-Loch 48-Loch 96-Loch | Greiner bio-one (Frickenhausen) |
| Gewebekulturschalen 60 mm 100 mm | Greiner bio-one (Frickenhausen) |
| Glassware | Schott (Mainz) |
| Falcon Primaria Platten (12-Loch) | Becton, Dickinson & Company (Sparks, USA) |
| Kosmetiktuch | Igefa (Ahrensfelde) |
| Latexhandschuhe | VWR (Darmstadt) |
| Microplatte 96-Loch, PS, F-Boden, µClear | Greiner bio-one (Frickenhausen) |
| Nitrocellulose-Membran | Schleicher & Schüll (Dassel) |
| Objektträger Superfrost Plus | Menzel-Gläser (Braunschweig) |

Fortsetzung Tabelle 1: verwendete Materialien

| Material | | Hersteller |
|--|----------------------------|----------------------------------|
| Parafilm | | American Nat. Can (Chicago, USA) |
| Pipettenspitzen Diamond | D1000 D200 D10 | Gilson (Middleton, USA) |
| Pipettenspitzen Eppendorf | Style 1000 µl 200 µl | Greiner bio-one (Frickenhausen) |
| Polypropylengefäße | 13 ml 15 ml 50 ml | Sarstedt (Nürnbrecht) |
| Polysterengefäße | 12 ml | Greiner bio-one (Frickenhausen) |
| quadriPerm-Platten | | Sarstedt (Nürnbrecht) |
| Reagiergefäße, Polypropylen | 0,5 ml 1,5 ml 2,0 ml | Sarstedt (Nürnbrecht) |
| Röntgenfilme | 18 x 24 cm | CEA (Hamburg) |
| SFCA Filter Unit 500 ml | (75 mm Ø) | Nalgene (Roskilde, Dänemark) |
| Sterilfilter | 0,2 µM / 0,45 µM | Schleicher & Schüll (Dassel) |
| View Plate 96-Loch FTC (für BrdU-Assay) | | Perkin Elmer (Waltham, USA) |
| Whatman Gel Blotting Papier | | Schleicher & Schüll (Dassel) |
| Zellschaber | | Sarstedt (Nürnbrecht) |

2.2 CHEMIKALIEN

Tabelle 2: verwendete Chemikalien

| Reagenz | Hersteller |
|--|------------------------------------|
| Aceton | Carl Roth GmbH (Karlsruhe) |
| Agarose | Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim) |
| Ampicillin | SIGMA (Deisenhofen) |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Merck (Darmstadt) |
| Bacto-Agar | BD Biosciences (Heidelberg) |
| Bromphenolblau | SIGMA (Deisenhofen) |
| Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent | Thermo Scientific (Langenselbold) |
| Kristallviolett | Serva Electrophoresis (Heidelberg) |
| Desoxy-Nucleotidtriphosphate (dNTPs) | Fermentas GmbH (St. Leon-Roth) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | SIGMA (Deisenhofen) |
| Dithiothreitol (DTT) | Serva Electrophoresis (Heidelberg) |
| DNase-freie RNase | Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) |
| Doxycycline hyclate | SIGMA (Deisenhofen) |
| Amersham™ ECL (Plus) Western Blotting Detection Reagents | Amersham Biosciences (Freiburg) |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Carl Roth GmbH (Karlsruhe) |
| Ethanol | Carl Roth GmbH (Karlsruhe) |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim) |
| Formaldehyd 37 % | Carl Roth GmbH (Karlsruhe) |
| Gelatine | SIGMA (Deisenhofen) |
| Glycerin (87 %) | Carl Roth GmbH (Karlsruhe) |
| Isopropanol | Carl Roth GmbH (Karlsruhe) |
| Kälberserumalbumin (BSA) | SIGMA (Deisenhofen) |
| Di-Kaliumhydrogenphosphat-Lösung | Merck (Darmstadt) |
| Kanamycin | SIGMA (Deisenhofen) |

Fortsetzung Tabelle 2: verwendete Chemikalien

| Reagenz | Hersteller |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Luria Broth, Luria Agar | SIGMA (Deisenhofen) |
| Magnesiumchlorid | Carl Roth GmbH (Karlsruhe) |
| Methanol | Carl Roth GmbH (Karlsruhe) |
| Milchpulver | SIGMA (Deisenhofen) |
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl Roth GmbH (Karlsruhe) |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Carl Roth GmbH (Karlsruhe) |
| Di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung | Merck (Darmstadt) |
| Natronlauge | Carl Roth GmbH (Karlsruhe) |
| 4 % Paraformaldehyd (PFA) | USB Corporation (Cleveland, USA) |
| Polyacrylamid | AppliChem (Darmstadt) |
| Ponceaurot | Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim) |
| Propidium-Iodid | Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim) |
| Protease Arrest | G-Biosciences (Maryland Heights, USA) |
| Rotiphorese® Gel 30 | Carl Roth GmbH (Karlsruhe) |
| Salzsäure | Merck (Darmstadt) |
| Succrose | SIGMA (Deisenhofen) |
| SYBR® green | Applied Biosystems (Darmstadt) |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Carl Roth GmbH (Karlsruhe) |
| Thiazolylblau | Carl Roth GmbH (Karlsruhe) |
| Tris | Carl Roth GmbH (Karlsruhe) |
| Triton X-100 | Carl Roth GmbH (Karlsruhe) |
| Tween® 20 | Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim) |
| VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI | Vector Laboratories (Burlingame, USA) |

2.3 LABORGERÄTE

Tabelle 3: verwendete Geräte

| Gerät | Hersteller |
|---|--|
| 5100 Cryo 1°C Freezing Container „Mr. Frosty“ | Nalgene Labware (Wiesbaden) |
| 7500 Fast Real-Time PCR Systems | Applied Biosystems (Carlsbad, USA) |
| Autoklav 3850 EL | Tuttnauer Europe B.V. (Breda, Niederlande) |
| Biophotometer | Eppendorf (Hamburg) |
| Brutschrank 6000 | Heraeus Instruments (Dreieich) |
| Cell Observer® fluorescence microscope | Carl Zeiss (Jena) |
| Certomat H + R | B.Braun (Melsungen) |
| Chemocam | Intas (Göttingen) |
| DNA Engine® Thermal Cycler | Biorad Laboratories GmbH (München) |
| Durchflusszytometer LSR II | BD Biosciences (Heidelberg) |
| Electrophoresis Power Supply EPS3500 | Pharmacia (Uppsala, Schweden) |
| Elektrophoresekammer | Thermo Scientific (Dreieich) |
| Einkanalpipetten Discovery Comfort DV10C (0,5-10 µl) DV20C (2-20 µl) DV200C (20-200 µl) DV1000C (100-1000 µl) | Abimed (Langenfeld) |
| Feinwaage Mettler AE163 | Mettler-Toledo GmbH (Giessen) |
| Gefriertank HC35 | Taylor-Wharton (Theodore, USA) |
| Gel Print 1000i | BioPhotonics Corporation (New York, USA) |
| Inkubations-Inaktivierungsbad 1003 | GFL (Burgwedel) |
| Inkubationsschüttler | Köttermann (Uetze / Hänigsen) |
| Magnetrührer MR2002 | Heidolph Instruments (Schwabach) |
| Mehrkanalpipette Acura 855 0,5-10 µl, 8 Kanäle | Socorex (Ecublens, CH) |
| Mehrkanalpipette Eppendorf Research 10-100 µl, 8 Kanäle | Eppendorf (Hamburg) |

Fortsetzung Tabelle 3: verwendete Geräte

| Gerät | Hersteller |
|---|---|
| Microtom | Zeiss (Oberkochen) |
| Microwelle VIP 20 | Bauknecht Hausgeräte GmbH (Stuttgart) |
| Mikroskop | Olympus (Hamburg) |
| Miniprep 75 | Tecan Deutschland GmbH (Crailsheim) |
| Multiskan FC | Thermo Scientific (Dreieich) |
| Luminometer Centro LB 960 | Berthold Technologies (Stuttgart) |
| Nanodrop 1000 | PeqLab Biotechnologies GmbH (Erlangen) |
| pH-Meter 761 Calimatic | Knick (Berlin) |
| Pipettboy Acu | Integra Biosciences (Zizers, CH) |
| Sterilbank Bio-II-a | Telstar (Terrasa, Spanien) |
| Thermomixer 5436 | Eppendorf (Hamburg) |
| Tiefkühlager Hera freeze | Thermo Electron Corporation (Karlsruhe) |
| Tissue Microarrayer | Beecher Instruments (Sun Prairie, USA) |
| UV Stratalinker™ 2400 | Stratagene (Heidelberg) |
| Ventana BenchMark XT System | Ventana Medical Systems (Tucson, USA) |
| Vortexer VF2 | IKA Labortechnik (Staufen) |
| Wasserbad | Eppendorf (Hamburg) |
| Western Blot Aparatur | Biozym (Hessisch Oldendorf) |
| Zentrifuge Cryofuge 5000 | Heraeus Instruments (Dreieich) |
| Zentrifuge Heraeus Pico 17 | Thermo Scientific (Dreieich) |
| Zentrifuge Heraeus Multifuge 3SR+ | Thermo Scientific (Dreieich) |
| Zentrifuge Labofuge 400e | Heraeus Instruments (Dreieich) |
| Zentrifuge Rotixa 120R | Hettich GmbH (Tuttlingen) |
| Zentrifuge SpeedVac Vacuum Concentrator | Bachofer (Reutlingen) |
| Zentrifuge Varifuge K | Heraeus Instruments (Dreieich) |

2.4 KONSTRUKTE UND VEKTOREN

Tabelle 4: Expressionsvektoren und Vektoren für die Gateway®-Klonierung

| Vektor | Beschreibung | Hersteller | Referenz |
|------------|--|--|--|
| pECFP-C1 | Farbvariante des GFP-Vektors (C yan F luorescing P rotein) | Clontech (Saint Germain-en-Laye, France) | (Simpson et al. 2000) |
| pEYFP-N1 | Farbvariante des GFP-Vektors (Y ellow F luorescing P rotein) | | |
| pGFP | Expressionsvektor (G reen F luorescing P rotein) | | |
| pDEST-CFP | CFP bzw. YFP als Destination-Vektor für das Gateway®-System | selbst hergestellt | Protokoll Gateway® Technology with Clonase™ II, Version A (2004) |
| pDEST-YFP | | | |
| pDONR™ 221 | Donor-Vektor für Gateway® | Life Technologies (Darmstadt) | |
| pENTR™-gus | Kontroll-Vektor | | |

Tabelle 5: Überexpressions- und Repressionskonstrukte für Cofilin-1

| Vektor | Insert | Vektor | Referenz / Hersteller |
|----------------------|--|-----------|---|
| CFL1-CFP | Humanes Cofilin-1; NM_005507 | pDEST-CFP | selbst hergestellt |
| CFL1-YFP | Humanes Cofilin-1; NM_005507 | pDEST-YFP | selbst hergestellt |
| pGIPZ-shCFL1 | shRNAmir-CFL1-Repressionskonstrukt; V3LHS_342369 | pGIPZ | Open Biosystems (Epsom, UK) |
| pTRIPZ-shCFL1 | shRNAmir-CFL1-Repressionskonstrukt | pTRIPZ | Selbst hergestellt; Umklonierung von pGIPZ in pTRIPZ; Originalvektor pTRIPZ von Open Biosystems (Epsom, UK) |

2.5 OLIGONUKLEOTIDE

a) Überexpression der Kandidatengene:

Tabelle 6: Primer für die Gateway®-Klonierung

| Name | Sequenz | Referenz |
|-------------------|--|--|
| attB1_forw | 5'-GGGG-ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTNN-(Template-spezifische Sequenz)-3' | Protokoll Gateway® Technology with Clonase™ II, Version A (2004) |
| attB1_rev | 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTA (18-25 Gen-spezifische Nukleotide)-3' | |

b) Repression der Kandidatengene:

Analog zu den Überexpressionskonstrukten wurde für insgesamt 106 verschiedene Gene eine RNAi-Bibliothek von der Firma Dharmacon (Lafayette, USA) bezogen. Die Stamplatten enthielten für jedes Gen eine Kombination aus 4 siRNAs mit unterschiedlichen Targetsequenzen. Die lyophilisierten Proben wurden mit siRNA-Puffer (1x, Dharmacon) gelöst (Stammkonzentration: 100 µM). Eine Gesamtliste der siRNAs und ihrer Sequenzen befindet sich im Anhang (s. Tab. 42, S. 128 ff).

c) Expressions-Kontrolle von CFL1:

Tabelle 7: Primer für die qRT-PCR

| Name | Sequenz | Herkunft |
|-------------------|--------------------------------|--------------------|
| CFL1_forw | 5'-CCTATGAGACCAAGGAGAGCAAGA-3' | Biomers GmbH (Ulm) |
| CFL1_rev | 5'-TTGGAGCTGGCATAAATCATTTT-3' | |
| RPLP0_forw | 5'-AGTTTCTCCAGAGCTGGGTTGT-3' | |
| RPLP0_rev | 5'-TGGGCAAGAACACCATGATG-3' | |

2.6 ENZYME

Tabelle 8: verwendete Enzyme

| Reagenz | Herkunft |
|--|---|
| Gateway® BP clonase™ II | Invitrogen, Life Technologies (Darmstadt) |
| Gateway® LR clonase™ II | |
| Proteinase K | |
| SuperScript® III Reverse Transkriptase | |
| Age I | New England BioLabs® (Ipswich, USA) |
| Bgl II | |
| EcoRI | |
| EcoRV | |
| Hind III | |
| Mlu I | |
| Nco I | |
| Nde | |
| Nhe I | |
| Sac I | |
| Sac II | |
| Sal I | |
| Omniscript™ Reverse Transkriptase | Qiagen (Hilden) |
| T4 DNA Ligase | New England BioLabs® (Ipswich, USA) |
| Xho I | New England BioLabs® (Ipswich, USA) |

2.7 STANDARDS

DNA-Standards:

| | |
|------------------------------|----------------|
| GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder | Fermentas |
| #SM0241 | (St. Leon-Rot) |
| GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder | Fermentas |
| #SM0311 | (St. Leon-Rot) |

Protein-Standards:

| | |
|---|----------------------|
| PageRuler™ Prestained Protein Ladder | Thermo Scientific |
| (10 - 170 kDa) | (Dreieich) |
| Precision Plus Protein™ Standards Kaleidoscope™ | Bio-Rad Laboratories |
| (10 - 250 kDa) | GmbH (München) |

2.8 KITS

Tabelle 9: verwendete Kits

| Kit | Hersteller |
|---|---------------------------------------|
| Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemoluminiscent) | Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) |
| Gateway® Technology with Clonase™ II | Life Technologies (Darmstadt) |
| Gateway® Vector Conversion System | Life Technologies (Darmstadt) |
| NucleoBond® PC 500 | Macherey-Nagel (Düren) |
| NucleoSpin® Plasmid Kit | Macherey-Nagel (Düren) |
| Omniscript RT Kit | Qiagen (Hilden) |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen (Hilden) |
| peqGOLD Total RNA Kit | PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen) |
| SuperScript® III Reverse Transkriptase | Life Technologies (Darmstadt) |

2.9 ANTIKÖRPER

Tabelle 10: Primär-Antikörper für die Immunzytochemie

| Name | Herkunft | Kat.-Nr. | Hersteller | Verdünnung |
|-----------------------------------|-----------|----------|---|------------|
| anti-ACTIVE® Caspase-3 | Kaninchen | #G7481 | Promega (Madison, USA) | 1:150 |
| anti-Cyclin B1 | Maus | #4135 | Cell Signaling Technology (Danvers, USA) | 1:100 |
| anti-E-Cadherin | Maus | #610181 | BD Biosciences (Sparks, USA) | 1:100 |
| anti-Ki67 | Kaninchen | ab833 | Abcam (Cambridge, UK) | 1:400 |
| anti-Vimentin | Maus | ab28028 | Abcam (Cambridge, UK) | 1:200 |

Tabelle 11: Sekundär-Antikörper für die Immunzytochemie

| Name | Herkunft | Kat.-Nr. | Hersteller | Verdünnung |
|---|----------|----------|-----------------------|------------|
| anti-Kaninchen; Cy3-conjugated | Ziege | ab6939 | Abcam (Cambridge, UK) | 1:500 |
| anti-Maus; Cy3-conjugated | Ziege | ab97035 | Abcam (Cambridge, UK) | 1:500 |

Tabelle 12: Antikörper für die Immunhistochemie

| Name | Herkunft | Kat.-Nr. | Hersteller | Verdünnung |
|------------------|-----------|----------|-----------------------|------------|
| anti-CFL1 | Kaninchen | ab42824 | Abcam (Cambridge, UK) | 1:2.000 |

Tabelle 13: Primär-Antikörper für Western Blot Analysen

| Name | Herkunft | Kat.-Nr. | Hersteller | Verdünnung |
|-----------------------------------|-----------|-----------------|---|------------|
| anti-β-Aktin | Kaninchen | #sc-1616 HRP | Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA) | 1:30.000 |
| anti-Caspase-3 | Kaninchen | #9662 | Cell Signaling Technology (Danvers, USA) | 1:1.000 |
| anti-CFL1 | Kaninchen | ab42824 | Abcam (Cambridge, UK) | 1 µg/ml |
| anti-Cleaved Caspase-3 | Kaninchen | #9661 | Cell Signaling Technology (Danvers, USA) | 1:1.000 |
| anti-PARP | Kaninchen | #9542 | Cell Signaling Technology (Danvers, USA) | 1:1.000 |

Tabelle 14: Sekundär-Antikörper für Western Blot Analysen

| Name | Herkunft | Kat.-Nr. | Hersteller | Verdünnung |
|------------------------------|----------|----------|---|------------|
| anti-Kaninchen HRP-linked | Ziege | #7074 | Cell Signaling Technology (Danvers, USA) | 1:10.000 |

2.10 ZELLKULTUR

2.10.1 Nährmedien und Zusätze

Tabelle 15: verwendete Nährmedien und Zusätze für die Kultivierung von Zelllinien

| Reagenz | Hersteller |
|--|--|
| Doxycyclin (2 mg / ml) | SIGMA (Deisenhofen) |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Low Glucose, Pyruvate | GIBCO, Life Technologies (Darmstadt) |
| Dulbecco's PBS 1x | PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) |
| Gentamicin (10 mg / ml) | |
| fötales Rinderserum (FBS) | |
| Puromycin (10 mg / ml) | Invivogen (Toulouse, France) |
| 1x Trypsin / EDTA | GIBCO, Life Technologies (Darmstadt) |

Tabelle 16: verwendete Nährmedien und Zusätze für die Kultivierung von Bakterien

| Reagenz | Hersteller |
|--|--|
| Ampicillin (50 mg / ml) | SIGMA (Deisenhofen) |
| Gentamicin (10 mg / ml) | PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) |
| Kanamycin (50 mg / ml) | SIGMA (Deisenhofen) |
| LB-Medium (Luria broth) 25 g in 1 L A. dest | |
| LB-Agar (Luria Agar) 40 g in 1 L A. dest | |

2.10.2 Humane Zelllinien für die *in vitro*-Experimente

Tabelle 17: verwendete Zelllinien

| Zelllinie | Abstammung | Herkunft | Referenz |
|------------------------------|---|--|-----------------------|
| HEK-293 | humane, embryonale Nierenzellen | ATCC, American Type Culture Collection (Manassas, USA) | (zur Hausen 1967) |
| IMIM-PC1 / IMIM-PC2 | humanes Pankreaskarzinom | F.X. Real, Institute Municipale de Investigacion Medica (Barcelona, Spanien) | (Vila et al. 1995) |
| PANC-1 | humanes Pankreaskarzinom | ATCC, American Type Culture Collection (Manassas, USA) | (Lieber et al. 1975) |
| SUIT2-007 / SUIT2-028 | humanes Pankreaskarzinom / Lebermetastase | Iwamura T. (Japan) | (Iwamura et al. 1987) |

Tabelle 18: verwendete Bakterienstämme

| Name | Herkunft |
|--|---|
| One Shot® TOP-10 Chemically Competent E. coli | Invitrogen, Life Technologies (Darmstadt) |
| One Shot® TOP-10F' Chemically Competent E. coli | |

3 METHODEN

3.1 ALLGEMEINE ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

3.1.1 Kultivierung verschiedener Zelllinien

Als Kultivierungsmedium für die Zelllinien HEK-293, PANC-1, IMIM-PC1 und -PC2, sowie SUIT2-007 und -028 (vgl. Kap. 2.10.2) diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), versetzt mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS) und Gentamicin (0,05 mg / ml) (im Folgenden: Vollmedium). Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator gelagert. Der Zustand und das Wachstum der Zellen wurden regelmäßig lichtmikroskopisch überwacht. Bei einer Konfluenz von 70 – 80 % wurden die Zellen mit 10 ml 1x PBS gewaschen, anschließend mit 2,5 ml Trypsin / EDTA versetzt und in Abhängigkeit ihrer Wachstumsgeschwindigkeit in Verdünnungen zwischen 1:5 bis 1:20 zur Weiterkultivierung in eine Zellkulturflasche mit frischem Vollmedium überführt.

3.1.2 Zellzahlbestimmung und Aussäen von Zellen

Für die Ermittlung der Zellzahl wurde ein Neubauer-Hämozytometer verwendet. Die sorgfältig vereinzelter Zellen wurden seitlich in die Zählkammer pipettiert, wo sie sich durch die Kapillarkräfte gleichmäßig im definierten Zwischenraum der Kammer verteilen. Die Zellen in den 4 Eckquadranten der Kammer wurden ausgezählt. Der Mittelwert dieser 4 Werte wurde mit dem Faktor 1×10^4 multipliziert, wodurch sich die Zellzahl in einem Milliliter Suspension errechnete.

3.1.3 Kryo-Konservierung

Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zelllinien in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Hierzu wurden die einzufrierenden Zellen mit einer 10 %-igen DMSO-Lösung (10 % DMSO in FBS) versetzt, welches als Frostschutzmittel dient. Es folgte die Überführung in ein Kryogefäß, welches über Nacht bei -80°C im Kryo-Container „Mr. Frosty“ eingefroren wurde. Der Kryo-Container war gefüllt mit 2-Propanol, um eine gleichmäßige Abkühlung von 1°C / min zu gewährleisten. Am nächsten Tag konnten die Kryogefäße zur Dauerlagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt werden.

Zur Rekultivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden in 5 ml Vollmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche (25 cm²) überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, um vorhandene DMSO-Rückstände zu entfernen.

3.2 PARALLELISIERTE CHARAKTERISIERUNG

3.2.1 Herstellung der Überexpressionskonstrukte

3.2.1.1 Klonierung mit dem Gateway®-System

Für die parallelisierte Analyse von 79 Kandidatengenen wurden zunächst cDNA- bzw. ORF-Klone (ORF = engl. Open Reading Frame; Offener Leserahmen) der Targetsequenzen kommerziell von der Firma Open Biosystems erworben. Bei den Kandidaten handelte es sich um solche Gene, die in den vorangegangenen Analysen auffällige Expressionsmuster aufgezeigt haben (vgl. Einleitung Kap. 1.3.1). Diese konnten in 3 verschiedene Gruppen eingeteilt werden: a) im Pankreaskarzinom überexprimierte Gene (n = 39; Abk. ÜE); b) im Pankreaskarzinom unterexprimierte Gene (n = 11; Abk. UE); c) in PanIN-Läsionen spezifisch exprimierte Gene (n = 16; Abk. PanIN). Zusätzlich wurden weitere 13 Gene als Kontrollgene in der Analyse mitgeführt (Abk. K). Eine genaue Liste der einzelnen Kandidatengene und ihrer Sequenzen befindet sich im Anhang (Tab. 40, s. S. 126f). Um die spätere Überexpression der Zielgene in den Zellen verfolgen zu können, wurden diese Targetsequenzen in Vektoren mit verschiedenen Fluoreszenzmarkern kloniert (vgl. Kap. 2.4). Hierzu wurde das Kit Gateway® Technology with Clonase™ II der Firma Qiagen verwendet. Diese Technologie basiert auf einem Lambda-Bakteriophagen-Rekombinationssystem, bei dem die Rekombination immer zwischen spezifischen *att*-Bindungsstellen (engl. *att*-sites) der interagierenden DNA-Moleküle stattfindet.

Es erfolgen 2 Rekombinations-Reaktionen: die BP-Reaktion und die nachfolgende LR-Reaktion. Zunächst erfolgt via Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eine Flankierung der spezifischen Targetsequenzen mit den *att*-sites, indem spezifische Gateway®-Primer generiert werden (vgl. Kap. 2.5). Diese Amplifikationsprodukte werden verwendet, um sie in der BP-Reaktion mit dem *Donor*-Vektor (pDONR™221) des Gateway®-Systems zu rekombinieren. Nach der folgenden Transformation (vgl. Kap. 3.2.1.2) in

kompetente *E. coli*-Zellen erhält man einen *Entry*-Klon (Vektor pENTR™), der als Target für die LR-Reaktion dient. Hier wird der *Entry*-Klon mit einem *Destination*-Vektor rekombiniert, um letztendlich einen Expressionsklon zu erhalten, der das Zielgen enthält. Wie oben beschrieben, beinhalteten die *Destination*-Vektoren in diesem Fall die Fluoreszenzmarker CFP und YFP. Zu diesem Zweck wurden die Vektoren pECFP und pEYFP (vgl. Kap. 2.4) zunächst mithilfe des Gateway® Vector Conversion Systems (Qiagen) in einen *Destination*-Vektor konvertiert. Im Zuge der LR-Reaktion wurde die Zielgen-Sequenz aus dem *Entry*-Klon jeweils in den resultierenden pDEST-CFP- bzw. pDEST-YFP-Vektor überführt und anschließend in *E.coli*-Zellen transformiert. Der Erfolg der Gateway®-Reaktionen wurde mittels Sequenzierung und Restriktionsendonukleasen überprüft. Das genaue Verfahren ist im Herstellerprotokoll nachzulesen. Nachdem dieser Vorgang für alle Zielgen-Sequenzen durchgeführt wurde, konnte die Plasmid-DNA isoliert und für die Überexpressions-Experimente verwendet werden.

Für 22 der 79 Kandidatengene war die Rekombination der Targetsequenzen mit dem pDONR™221-Vektor nicht erfolgreich und es konnte kein Gateway®-kompatibler *Entry*-Klon generiert werden. Deshalb wurden für diese Gene die *Entry*-Klone von der Firma Open Biosystems kommerziell erworben (vgl. Tab 19).

Tabelle 19: Sequenzen im Vektor pENTR™221

| Gen | Expression | Vektor | Gen | Expression | Vektor |
|---------|------------|-----------|--------|------------|-----------|
| CNR2 | ÜE | pENTR™221 | PLAC8 | PanIN | pENTR™221 |
| GSPT1 | ÜE | pENTR™221 | POLR3K | PanIN | pENTR™221 |
| MAP3K11 | ÜE | pENTR™221 | RAB34 | PanIN | pENTR™221 |
| AGR2 | PanIN | pENTR™221 | S100P | PanIN | pENTR™221 |
| C8orf20 | PanIN | pENTR™221 | SQLE | PanIN | pENTR™221 |
| CDC37 | PanIN | pENTR™221 | TFF1 | PanIN | pENTR™221 |
| CST3 | PanIN | pENTR™221 | BCL-10 | K | pENTR™221 |
| CYP4F12 | PanIN | pENTR™221 | CCND1 | K | pENTR™221 |
| FOXA3 | PanIN | pENTR™221 | MMP2 | K | pENTR™221 |
| IFI27 | PanIN | pENTR™221 | TGFBR2 | K | pENTR™221 |
| IL13R1A | PanIN | pENTR™221 | TIMP2 | K | pENTR™221 |

Der verwendete Vektor war hier nicht pENTR™, sondern pENTR™221 der sich von dem erstgenannten dadurch unterscheidet, dass er nach der Zielsequenz ein Stopcodon beinhaltet.

Beachtet man das Rekombinationsschema der Sequenz mit den pDEST-CFP- bzw. YFP-Vektoren (Abb. 4), so erweist sich dieses Stopcodon im Falle des YFP-Vektors als problematisch.

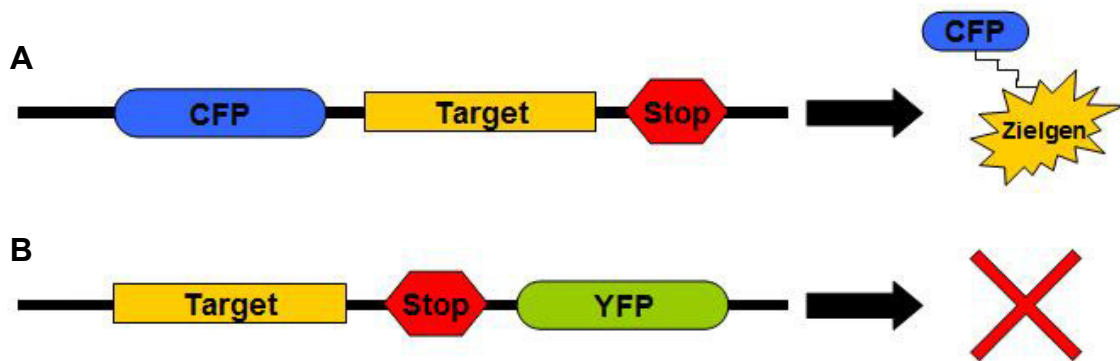


Abbildung 4: Anordnung der relevanten Targetsequenzen auf dem pENTR™221-Vektor.

A: Abfolge im generierten CFP-Vektor: Die Targetsequenz befindet sich hinter der Sequenz des CFP-Proteins, wodurch das beinhaltete Stopcodon am 5'-Ende angehängt wird. Bei der Transfektion des Vektors kann ein Fusionsprotein generiert werden. **B:** Abfolge im generierten YFP-Vektor: Das Stopcodon befindet sich zwischen der Targetsequenz und der Sequenz des YFP-Proteins. Eine Generierung des Fusionsproteins ist nicht möglich.

Da die Sequenz des YFP-Proteins der Targetsequenz nachgeschaltet ist, befindet sich das Stopcodon zwischen den beiden Sequenzen. Dadurch ist die Generierung eines YFP-Fusionsproteins mit diesen Vektoren nicht möglich. Im Falle des CFP-Proteins ist das Stopcodon unproblematisch, da sich die CFP-Sequenz im Vektor vor der Targetsequenz befindet und das Stopcodon somit hinter den für das Fusionsprotein benötigten Sequenzen liegt.

Für die später ausgewählten PaCaNet-Gene wurden die Zielsequenzen schon fertig rekombiniert im Gateway®-kompatiblen pENTR™-Vektoren erworben. Dadurch konnte auch für diese Gene die BP-Reaktion übersprungen und sofort mit der LR-Reaktion gestartet werden, wobei hier kein Stopcodon beinhaltet war. Es wurde dasselbe Verfahren angewendet wie für die restlichen 79 Kandidatengene.

3.2.1.2 Transformation in kompetente Bakterien

Zur Transformation der Plasmide in One Shot® TOP-10 Chemically Competent *E. coli*-Zellen wurden jeweils 5 µl Ligationsmix zu 50 µl der Bakterienzellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein 35-sekündiger Hitzeschock bei 42°C, bevor der Transformationsansatz mit 500 µl LB-Medium versetzt wurde. Diese Kultur wurde für 1-2 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Von diesem Ansatz wurden anschließend 100 µl

auf eine Agarplatte ausplattiert (CFP-Konstrukte = Ampicillin-Platten; YFP-Konstrukte = Gentamicin-Platten) und diese über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde eine der erhaltenen Bakterienkolonien in 2 ml frischem LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotika angeimpft. Nach einer weiteren Inkubation über Nacht wurden 900 µl der Kultur als Glycerinstock bei -80°C eingelagert, der restliche Ansatz diente als Ausgangspunkt für die Weiterkultivierung und DNA-Isolation.

3.2.1.3 Extraktion der Plasmid-DNA

Für die Isolation der Plasmid-DNA aus den transformierten Bakterien wurden 500 ml-Übernacht-Kulturen angesetzt. Dazu wurde LB-Medium (25 g Luria Broth auf 1 L A. dest; autoklaviert) mit den entsprechenden Antibiotika versetzt (vgl. Tab. 20), mit den *E. coli*-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Schüttler inkubiert.

Tabelle 20: AB-Konzentrationen für die Kultivierung

| Konstrukt | Antibiotikum | Konzentration |
|-----------|--------------|---------------|
| CFP | Ampicillin | 5 µg / ml |
| YFP | Gentamicin | 2 µg / ml |
| GFP | Kanamycin | 5 µg / ml |

Die Extraktion der Plasmid-DNA erfolgte mithilfe des NucleoBond® PC 500-Kits der Firma Macherey-Nagel nach den Herstellerangaben. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Nanodrop ND-1000 der Firma Peqlab, eine weitere Lagerung bei -20°C.

3.2.2 Herstellung der „Reverse Transfection“-Arrays

Für die „Reverse Transfection“-Arrays (vgl. Einleitung Kap. 1.3.2) wurde ein Protokoll etabliert, um diese mit dem Tecan Miniprep 75 Roboter in einem automatisierten Verfahren herzustellen. Dazu wurde mithilfe des Roboters zunächst für 40 CFP- und 40 YFP-Konstrukte der folgende Transfektionsmix in einer Cellstar 96-Loch-Platte angesetzt:

Tabelle 21: Transfektionsmix für die reverse Transfektion

| Reagenz | Menge |
|---|-------|
| Dulbecco's PBS 1x | 11 µl |
| Lipofectamine® 2000 | 2 µl |
| Plasmid-DNA a) Gene AMF-PPP2R4 b) Gene PROC-BAX | 4 µg |
| Inkubation: 20min, RT | |
| Gelatine (0,2 % in PBS) | 15 µl |

Dieser Reaktionsansatz wurde mithilfe des Roboters auf Superfrost Plus Objektträger gespottet. Dazu nahm der Roboter in einer 10 µl-Spitze den Reaktionsmix auf und berührte mit dieser Spitze eine Reihe von 15 Objektträgern. Durch die Adhäsionskräfte wurde auf den Objektträgern ein Transfektions-Spot von 0,5-1,5 mm Durchmesser gebildet. Eine Übersicht der Anordnung der Expressionskonstrukte auf den Objektträgern findet sich im Anhang (Abb. 37, s. S. 136). Die auf diese Art produzierten, gespotteten Objektträger (im Folgenden Slides genannt) wurden getrocknet und bei 4°C bis zu 3 Wochen gelagert.

3.2.3 Herstellung der „Live Cell Microarrays“

Die mit dem Roboter generierten DNA-Microarrays wurden für die Herstellung der „Live Cell Microarrays“ verwendet. Dazu wurden die Slides in quadriPerm-Platten platziert und mit Zellen in Vollmedium überschichtet (HEK-293: $4,5 \times 10^5$ Zellen; PANC-1: 4×10^5 Zellen; SUIT2-007: 3×10^5 Zellen). Anschließend erfolgte eine 48-stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂, bevor die Arrays für die weiteren Versuche fixiert wurden (vgl. Kap. 3.2.6).

3.2.4 Transfektion der PaCaNet-Gene

Für die PaCaNet-Gene erfolgte die Transfektion nicht im „Reverse Transfection“-Format, sondern dem normalen Ablauf folgend in einer 24-Loch-Platte. Dazu wurden jeweils 4×10^4 Zellen auf Deckgläsern in die Platten gesät, um ein späteres Eindeckeln der Zellen zu ermöglichen. Nach 24 h erfolgte die Transfektion mit dem Reagenz Effectene® der Firma Qiagen nach Herstellerprotokoll. Nach weiteren 48 h konnten die

Zellen direkt auf den Deckgläsern fixiert werden und waren bereit für weitere Experimente.

3.2.5 Transfektion der siRNA-Library

Die Transfektion der siRNA-Library (vgl. Kap. 2.5) erfolgte in 96-Loch-Platten. Dazu wurden 5×10^3 Zellen in ViewPlate 96-Loch-Platten (Perkin Elmer) ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit SiLentFect™ der Firma Bio-Rad (München) nach folgendem Protokoll:

| | |
|----------|---|
| 24 µl | FBS-freies DMEM |
| + 2 µl | SiLentFect™ |
| + 3,2 µl | siRNA-Pool bzw. "Non-Silencing"-Kontrolle (20 µM) |

Dieser Ansatz wurde zu den jeweiligen Platten pipettiert, in die zuvor 172 µl Vollmedium vorgelegt wurde. Nach einer weiteren Inkubation von 48 h wurden die weiterführenden Assays durchgeführt.

3.2.6 Funktionelle Analysen

3.2.6.1 Analyse der Überexpressionseffekte

Um zu analysieren, welchen Einfluss eine Überexpression der verschiedenen Kandidatengene auf die zellulären Funktionen ausübt, wurden die Zellen immunzytologisch mit verschiedenen Antikörpern behandelt (vgl. Kap. 2.9).

Die Fixierung und Durchführung dieser Experimente erfolgte direkt auf den Slides in quadriPerm-Platten. Die immunzytologische Färbung erfolgte nach den Protokollen in nachstehenden Tabellen 22 und 23.

Tabelle 22: Protokolle zur Durchführung der immunzytologischen Färbungen

| | Caspase3 | Ki67 | Cyclin D1 | Vimentin | E-Cadherin |
|-------------------------|---|-------------------------------|--|--|--|
| Fixierung | PFA (4% in PBS) 20 min, RT | | | | 1:2 Methanol / Aceton 15 min, RT |
| Permeabili- sierung | TBS + Triton 0,2% 20 min, RT | | PBS + Triton (1%) 25 min, RT | PBS + Triton (1%) 10 min, RT | entfällt |
| Waschen | 3x mit TBS je 5 min, RT | | 3x in PBS je 5 min, RT | | |
| Blocking Puffer (PB) | TBS-T (0,1%) + 10% FBS; 2 h, RT | | PBS + 5% Milch 1 h, RT | PBS-T (0,1%) + 5% Milch 1 h, RT | TBS + 5% Milch 1 h, RT |
| 1. Antikörper | 1:150 in BP 4 h, RT | 1:400 in BP 4 h, RT | 1:100 in PBS-T (0,2%) + 1% Milch über Nacht, 4°C | 1:200 in BP 1 h, RT | 1:100 in TBS-T (0,2%) + 1% Milch über Nacht, 4°C |
| Waschen | 2x mit TBS 2x mit TBS-T 2x mit TBS je 10 min, RT | 3x in TBS je 5 min, RT | 3x in PBS je 5 min, RT | | |
| 2. Antikörper | Cy3-anti-Kaninchen 1:250 in BP 2 h, RT, im Dunkeln | | Cy3-anti- Maus 1:500 in PBS- T (0,2%) + 5% Milch 1 h, RT, im Dunkeln | Cy3-anti- Maus 1:500 in BP 1 h, RT, im Dunkeln | Cy3-anti-Maus 1:500 in TBS-T (0,2%) + 5 % Milch 1 h, RT, im Dunkeln |
| Waschen | 2x mit TBS 1x mit TBS- T 1x mit TBS je 5 min, RT, im Dunkeln | 3x in TBS je 5 min, RT | 3x in PBS 5 min, RT | | |
| Eindeckeln | Eindeckel-Medium mit DAPI | | | | |

BP = Blocking Puffer; PBS = s. Folgeseite.; PBS-T = PBS + Tween 20; PFA = Paraformaldehyd; TBS= s. Folgeseite; TBS-T = TBS + Tween 20;

Tabelle 23: verwendete Puffer für die Immunzytologie

| TBS 10x | | PBS 10x | |
|--------------------------------------|--------|---------------------------------------|---------|
| Tris Base | 24,2 g | NaCl | 80 g |
| NaCl | 80 g | KCl | 2 g |
| HCl (37%ig) | 15 ml | Na ₂ HPO ₄ | 14,4 g |
| | | KH ₂ PO ₄ | 2,4 g |
| | | A. dest | 1000 ml |
| pH 7,6 einstellen | | pH auf 7,4 einstellen | |
| für TBS 1x mit A-dest 1:10 verdünnen | | für PBS 1x mit A. dest 1:10 verdünnen | |

3.2.6.2 Analyse der Repressionseffekte

Um auch die Effekte der reprimierten Kandidatengene auf die unterschiedlichen Zellfunktionen zu überprüfen, wurden wie zuvor immunzytologische Färbungen durchgeführt, um den Einfluss der Repression auf Wachstum und Differenzierungsgrad der Zellen zu analysieren. Dafür wurden die Antikörper Cyclin B1, Vimentin und E-Cadherin verwendet (vgl. Kap. 2.9 & 3.2.6.1). Dieser Teil der Analyse wurde wie im Bereich der Überexpression von Tatjana Honstein durchgeführt.

Zusätzlich zu diesen Experimenten waren weitere Wachstums- und Zelltodanalysen mit dem Caspase-3- und dem Ki67-Antikörper geplant, um die Daten aus den Überexpressionsanalysen zu vervollständigen. Letztendlich war eine Etablierung dieser Assays aufgrund von unspezifischen Antikörperbindungen jedoch nicht möglich, wodurch dieser Teil der Analyse verworfen werden musste.

3.3 EVALUATION UND VALIDIERUNG

3.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Zur Auswertung der „Live Cell Microarrays“ bzw. der reprimierten Zellen wurde das Zeiss Cell Observer® Fluoreszenzmikroskop verwendet. Die einzelnen Array-Positionen wurden angefahren und die transfizierten Zellen in verschiedenen Vergrößerungen (100x, 200x, 630x) fotografiert, um die verschiedenen zellulären Lokalisationen der Genprodukte zu bestimmen. Nach der immunzytologischen Behandlung der Microarrays wurden auch die gegebenenfalls vorhandenen Antikörper-

Signale dokumentiert. Dabei wurden ebenfalls Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen gemacht.

Für jede Zelllinie und Array-Position wurden mindestens 3 verwertbare Durchgänge dokumentiert. Dabei wurde die Lokalisation erfasst und die Antikörper-Signale bewertet. Für reproduzierbare, deutlich erkennbare Signale ($n \geq 3$) wurde das Zeichen „++“ verwendet. Verwertbare Signale, die nicht eindeutig reproduzierbar waren ($1 \leq n \leq 3$), wurden mit „+“ bewertet. Signale, die nur zeitweise beobachtet oder nicht eindeutig bestimmt werden konnten ($n = 1-2$ oder undeutlich), wurden mit „(+“ dokumentiert.

3.3.2 Validierung

Für die Kandidatengene, die in der Gesamtauswertung die deutlichsten und reproduzierbarsten Ergebnisse zeigten, wurden Validierungsassays im normalen Transfektionsformat durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in einer 24-Loch-Platte auf Deckgläser (\varnothing 12 mm) ausgesät. 48 h nach Transfektion mit dem Effectene®-Reagenz (verwendet nach Herstellerprotokoll) wurde erneut die Lokalisation der Genprodukte bestimmt sowie die verschiedenen Antikörper-Assays durchgeführt, um die Ergebnisse der reversen Transfektion zu überprüfen.

3.4 EINZEL-CHARAKTERISIERUNG VON CFL1

3.4.1 Molekularbiologische Methoden

3.4.1.1 RNA-Isolation aus Zellen

Die RNA-Isolierung aus kultivierten und transfizierten Zellen erfolgte für diese Arbeit mit dem peqGOLD Total RNA Kit der Firma Peqlab. Bei diesem Verfahren wird die RNA mithilfe verschiedener Säulen und mehreren Zentrifugationsschritten von den restlichen Zellbestandteilen getrennt und aufkonzentriert. Eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise findet sich im Handbuch der Firma PeqLab. Die Lagerung der RNA fand bei -80°C statt.

3.4.1.2 RNA-Isolation aus Gewebe

Um RNA aus humanem oder Xenograft-Gewebe zu isolieren, musste die tiefgefrorene Gewebeprobe zunächst homogenisiert werden. Dazu wurde ein kleines Fragment der Probe vorsichtig in einem sterilen, gekühlten Keramikmörser zerkleinert. Unmittelbar vor Zugabe der Probe wurde flüssiger Stickstoff im Mörser verdampft, um diesen weiter abzukühlen. Das bis auf Puderform zerkleinerte Gewebe wurde mit einem sterilen Einwegskalpell gesammelt und in ein Reagiergefäß überführt. Mörser und Pistill wurden anschließend zur erneuten Sterilisation mit 70 % Ethanol gereinigt und in Alufolie verpackt bei 200°C mindestens 3 h erhitzt.

Aus den so gewonnenen Gewebepulvern konnte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion die RNA gewonnen werden. Die Proben wurden dazu in 500 µl Qiazol-Puffer der Firma Qiagen (Hilden) resuspendiert, der sowohl Phenol als auch Guanidiniumthiocyanat enthält. Dieses Gemisch wurde mit 150 µl Chloroform versetzt und für 15 sec gevortext. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation (13.000 rpm, 4°C). Es ergab sich ein 2-phasiges System: in der unteren Phase sammeln sich die Proteine, die zu untersuchende RNA in der wässrigen Oberphase. Die Oberphase wurde vorsichtig abgenommen und zu 0,7 Teilen ihres Volumens mit 2-Propanol vermischt. Ab diesem Schritt sollte der Präparationsansatz stets gekühlt werden. Nach einer weiteren 10-minütigen Inkubation erfolgte erneut ein Zentrifugierschritt (12.000 rpm, 20 min, 4°C). Das entstandene Pellet wurde freigelegt und in 1 ml 70 % Ethanol resuspendiert. Durch einen letzten Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4°C und 13.000 rpm ergab sich ein Pellet, welches die RNA enthielt. Nach

Abdampfen der Ethanolreste konnte dieses in 55 µl RNase-freiem H₂O aufgenommen und die so gewonnene RNA bei -80°C gelagert werden.

3.4.1.3 cDNA-Synthese

Die Konzentration der aus den Zellen und Geweben extrahierten RNA wurde zunächst mit dem Nanodrop ND-1000 quantifiziert. Für die nachfolgende reverse Transkription der RNA in cDNA wurde in dieser Arbeit das Omniscript® Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen verwendet. Für den Einsatz in der quantitativen RealTime-PCR wurden jeweils 0,5-1 ng der RNA in cDNA transkribiert, wozu standardmäßig das folgende, modifizierte Protokoll der Firma Qiagen benutzt wurde:

Tabelle 24: Reaktionsansatz für die reverse Transkription

| Reagenz | Menge / Probe | Endkonzentration |
|-------------------------------|-----------------------|------------------|
| Master Mix (Volumen 5,9 µl) | | |
| 10x Buffer RT | 2 µl | 1x |
| dNTP Mix (5 mM / dNTP) | 2 µl | 0,5 mM / dNTP |
| Oligo-dT Primer (100 µM) | 0,4 µl | 2 µM |
| Omniscript RT | 0,5 µl | 4 Units / Probe |
| A. dest | 1 µl | |
| | | |
| RNA-Probe (Volumen 14,1 µl) | | |
| RNA-Template | 0,5-1 µg / Probe | |
| RNase-freies H ₂ O | Auf 14,1 µl auffüllen | |
| | | |
| Gesamtvolumen | 20 µl | |

Dieser Reaktionsansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Lagerung der so hergestellten cDNA erfolgte bei -20°C.

3.4.1.4 Quantitative RealTime-PCR

Um die Expression der zu untersuchenden Gene in der gewonnenen cDNA zu quantifizieren, wurde die quantitative RealTime-Polymerase-Kettenreaktion (Abk. qRT-PCR) angewendet. Hierbei handelt es sich um eine abgewandelte Methode der herkömmlichen PCR, bei der mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen eine Quantifizierung

von Nukleinsäuren möglich wird. Für diese Arbeit wurde dafür der SYBR® Green PCR Master Mix der Firma Applied Biosystems verwendet. Für die Analyse wurde das 7500 Fast-System der gleichen Firma verwendet. Der Reaktionsmix wurde wie in nachfolgender Tabelle 25 angesetzt.

Tabelle 25: Reaktionsansatz für die quantitative RealTime-PCR

| Reagenz | Menge |
|--------------------------|--------------|
| SYBR® Green | 10 µl |
| Primer forward [10 pmol] | 0,2 µl |
| Primer reverse [10 pmol] | 0,2 µl |
| A. dest | 8,6 µl |
| DNA (1:10 verd.) | 1 µl |
| Gesamtvolumen | 20 µl |

Die cDNA wurde für diesen Ansatz 1:10 verdünnt. Die Sequenzen der verwendeten Primer wurden mithilfe der Software PrimerExpress® der Firma Applied Biosystems generiert. Als Referenzgen wurde das ribosomale Protein RPLP0 verwendet (vgl. Kap. 2.5). Die Ergebnisse wurden mithilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Applied Biosystems) ausgewertet.

3.4.1.5 Klonierung von shRNA-Konstrukten gegen CFL1

Zur Herstellung von stabil transfizierten Zellklonen mit dauerhafter oder induzierbarer Repression der CFL1-Expression wurden verschiedene Vektorkonstrukte erzeugt.

Zunächst wurde ein kommerziell verfügbares shRNAmir-Repressionskonstrukt gegen CFL1 im Vektor pGIPZ (Open Biosystems, St. Leon-Rot), der für eine dauerhafte Expression der klonierten shRNAmir-Sequenz ausgelegt ist, bezogen. Zur Herstellung einer Variante mit induzierbarer Expression des gleichen shRNAmir-Konstrukts wurde zusätzlich der tetracyclin-induzierbare Vektor pTRIPZ derselben Firma erworben.

Nach den Angaben des Herstellers erfolgte eine Reklonierung des shRNAmir-CFL1-Konstrukts vom pGIPZ-Vektor in den pTRIPZ-Vektor, sowie eine Transformation des neu entstandenen Repressions-Konstrukts in kompetente *E. coli*-Bakterien (Stamm: One Shot® TOP-10 Chemically Competent E.coli; vgl. Kap. 2.10.2). Nach Isolierung der Plasmid-DNA mithilfe des NucleoSpin® Plasmid Kits (Macherey-Nagel) erfolgte eine Überprüfung des Erfolgs der Reklonierung mithilfe eines Kontrollverdaus (vgl.

Herstellerprotokoll Open Biosystems) und einer Sequenzierung. Das letztendlich für die weiteren Versuche ausgewählte shRNAmir-CFL1-pTRIPZ-Konstrukt wurde in einer 500 ml-Übernacht-Kultur expandiert und die Plasmid-DNA mithilfe des NucleoBond® PC500 Kits nach Anleitung des Herstellers extrahiert.

3.4.2 Zellbiologische Methoden

3.4.2.1 Transiente Transfektionen

Um die verschiedenen Zellen mit den Überexpressions- bzw. Repressionskonstrukten gegen CFL1 transient zu transfizieren, wurden sie je nach Zelllinie in Dichten zwischen 80.000 und 200.000 Zellen / Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte ausgesät.

Die Transfektion der Plasmid-DNA der Überexpressionskonstrukte CFL1-CFP und CFL1-YFP sowie dem Kontrollkonstrukt GFP (vgl. Kap. 2.4) erfolgte mit dem Reagenz Effectene® nach den Angaben des Herstellers.

Die Transfektion der 3 verschiedenen siRNAs gegen CFL1 und der Kontroll-siRNA (vgl. Kap. 2.5) erfolgte mit dem Reagenz SiLentFect™. Für eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte diente folgender Ansatz:

| | |
|----------|--|
| 150 µl | FBS-freies DMEM |
| + 3 µl | SiLentFect™ |
| + 150 µl | FBS-freies DMEM |
| + 4 µl | siRNA bzw. „Non-Silencing“-Kontrolle [20 µM] |

Die jeweiligen Transfektionsansätze wurden in einem Polystyren-Röhrchen vorbereitet. Die am Vortag in eine 6-Loch-Platte ausgesäten Zellen wurden mit 1,7 ml frischem Vollmedium versetzt und der Transfektionskomplex nach einer Inkubationszeit von 20 min bei RT vorsichtig zugegeben.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die siRNAs auch mit dem Transfektionsreagenz DharmaFECT der Firma Thermo Fisher Scientific transfiziert. Hierbei erfolgte die Transfektion in Suspension nach folgendem Protokoll:

Tabelle 26: Reaktionsansatz für die DharmaFECT-Transfektion

| Ansatz 1 | | Ansatz 2 | |
|--|--------------------------|----------|-----------------------------------|
| 150 µl | AB-freies DMEM + FBS 10% | 150 µl | AB-freies DMEM + FBS 10% |
| 4 µl | DharmaFECT | 4 µl | siRNA bzw. „NS“-Kontrolle [20 µM] |
| Inkubation der Ansätze: 5 min, RT | | | |
| Vermischen von Ansatz 1 & 2 durch Auf- und Abpipettieren | | | |
| Inkubation der Mischung: 20 min, RT | | | |

Dieser 400 µl-Transfektionsansatz wurde dann mit der geforderten Zellzahl vermischt und in einem Endvolumen von 2 ml pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank erfolgte ein Mediumwechsel, um das restliche Transfektionsreagenz zu entfernen.

3.4.2.2 Proliferationsassays

Um das Zellwachstum zu analysieren, wurden BrdU- und MTT-Assays durchgeführt. Die BrdU-Assays erfolgten mit dem Cell Proliferation ELISA, BrdU chemoluminescence Kit nach den Herstellerangaben. Dieses ermittelt die DNA-Synthese-Rate als Maß für die Zellteilungs-Aktivität. 24 h nach Transfektion wurden 5.000 - 7.500 Zellen pro Probe in jeweils 6 Vertiefungen einer ViewPlate-96 Black (Perkin Elmer) überführt. Dabei dienten 4 Vertiefungen als eigentlicher Messpunkt, 2 weitere als Hintergrundprobe. Weitere 24 h später erfolgte eine Inkubation der Zellen mit BrdU-haltigem DMEM für 4-6 h (37°C, 5% CO₂). Nach Fixierung und einer 1,5-stündigen Behandlung mit einem Peroxidase-konjugierten anti-BrdU Antikörper erfolgte die Messung der Chemolumineszenz (rlu / s) mithilfe des Luminometers Centro LB 960 (Berthold Technologies GmbH, Stuttgart).

Um neben der Wachstumsrate auch die eigentliche Zellviabilität zu ermitteln, wurden MTT-Versuche durchgeführt. Für diese Assays wurden 24 h nach Transfektion zwischen 20.000 und 30.000 Zellen / Probe in je 2 Vertiefungen einer 24-Loch-Zellkulturplatte (Greiner bio-one GmbH) umgesetzt. 48 und 72 h nach Transfektion erfolgte eine Behandlung mit 200 µl MTT-haltigem DMEMs pro Vertiefung der 24-Loch-Platte. Zur Herstellung dieses Mediums wurden 12 ml FBS-freies DMEM mit 1 ml MTT-Reagenz (5 mg Thiazolylblau gelöst in 1 ml PBS) versetzt. Die behandelten Platten wurden für 1,5 h bei 37°C inkubiert, währenddessen sich die Zellen braun bis blau anfärbten, beruhend auf der chemischen Reduktion des MTT-Farbstoffs. Für die Analyse wurde im Folgenden das MTT-haltige Medium entfernt und durch

Solubilisierungs-Lösung ersetzt (10 % Triton-100 & 10 % Salzsäure [1M] gelöst in Isopropanol), wodurch sich der Farbstoff aus den Zellen herauslöst. Um eine bessere Messbarkeit der intensiven Farblösungen zu erzielen, wurden diese in PBS verdünnt (i. d. R. 1:4). Die Extinktion wurde im Anschluss bei 570 nm mittels des Multiskan FC Photometers gemessen.

3.4.2.3 Modifiziertes Protokoll für die Proliferationsassays

Bei oben beschriebenem Protokoll für die Proliferationsassays ergab sich teilweise eine hohe Toxizität. Da dies vermutlich auch mit dem erneuten Umsetzen 24 h nach der Transfektion zusammenhing, wurde das Protokoll modifiziert, so dass dieser Schritt entfiel, um zusätzlichen Stress für die Zellen zu vermeiden. Hierbei werden die Zellen in Suspension mit dem DharmaFECT Transfektionsreagenz transfiziert (vgl. Kap. 3.4.2.1).

Nach 24 Stunden erfolgte bei diesem Protokoll nur ein Mediumwechsel. Die Zellen mussten nicht wie in Kap. 3.4.2.2 in neue Platten umgesetzt werden. 48 Stunden nach der Transfektion wurden der BrdU-Assay, sowie die RNA-Isolation durchgeführt. Weitere 24 Stunden später erfolgte der MTT-Assay.

3.4.2.4 Zellzyklus-Analysen

Für die durchfluss-zytometrischen Versuche wurden die Zellen 48 h nach Transfektion trypsinisiert und die in PBS überführte Suspension bei 1.200 rpm (3 min, RT) zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets wurden in 1 ml PBS resuspendiert und in 1,5 ml Reagiergefäße überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 6.000 rpm (5 min, RT) wurden die Pellets mit 50-100 µl PBS resuspendiert und sehr sorgfältig vereinzelt, da Zellduplexe im Durchfluss-Zytometer nicht analysiert werden können. Zur Fixierung der Zellen wurde die Suspension tropfenweise und unter kontinuierlichem Vortexen in 1 ml eiskaltes Ethanol (70 %) gegeben. Es erfolgte eine 24-stündige Inkubation der Proben bei 4°C.

Für die nachfolgende Zellzyklus-Analyse erfolgte eine Färbung der Zellsuspension mit Propidium-Iodid. Diese wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Zentrifugation: 1.000 g, 5 min, RT
- Überstand mit Einmalkanüle abnehmen
- 500 µl eiskaltes PBS zugeben, Pellet waschen

- Zentrifugation: 1.000 g, 5 min, RT
- Überstand verwerfen
- 500 µl Propidium-Iodid-Mix zugeben & resuspendieren
 - 1 mg / ml Propidium-Iodid
 - 500 µg / ml DNase-freie RNase
 - gelöst in 1x PBS
- Inkubation: 30-45 min, 4°C, Dunkelheit

Anschließend erfolgte die Analyse der Proben mit dem Durchfluss-Zytometer LSR II (BD Diagnostics, Heidelberg). Für die abschließende Auswertung der Daten wurde die Software ModFit (Verity Software House, Topsham, USA) verwendet.

3.4.2.5 Analyse des substratunabhängigen Wachstums

Für Softagar-Versuche wurden 5.000 bis 7.000 transfizierte Zellen mit 0,33%-igem Bacto-Agar, gelöst in Vollmedium, versetzt. Bei diesem Versuch muss das verwendete Medium permanent bei 42°C vorgewärmt werden, um ein vorzeitiges Aushärten des Bacto-Agars zu verhindern. Auch steigende Temperaturen über 42°C sind für das Überleben der Zellen zwingend zu vermeiden. Diese Zell-Agar-Medium-Mischung wurde in eine 12-Loch-Zellkulturplatte ausgesät, die zuvor mit einer Bodenschicht aus 0,5%-igem Bacto-Agar gefüllt wurde. Nachdem der zellhaltige Agar verfestigt war, wurde der Ansatz noch mit 750 µl Vollmedium überschichtet, um die Nährstoffversorgung zu gewährleisten und ein Austrocknen zu vermeiden. Die Zellen in dieser dreidimensionalen Schicht wurden bei der Koloniebildung kontinuierlich lichtmikroskopisch beobachtet. Nachdem die Kolonien nach 7-10 Tagen eine adäquate Größe erreicht hatten und bevor die Koloniedichte zu hoch wurde, wurden die entstandenen Kolonien bei 10-facher Vergrößerung in 5 verschiedenen Gesichtsfeldern pro Probe ausgezählt. Des Weiteren wurden mit 40-facher Vergrößerung Fotos der Kolonien aufgenommen, um deren Größe vergleichen zu können.

3.4.2.6 Migrationsassays

Neben den zytokinetischen Untersuchungen wurde auch der Einfluss der CFL1-Genexpression auf die Migrationsbewegungen der Zellen untersucht. Im Zuge dessen wurde sowohl die eher ungerichtete Zellbewegung mithilfe von „Time Lapse“-Analysen

sowie Wundheilungs-Assays als auch die gerichtete Migration in Richtung eines spezifischen Stimulus untersucht.

a) „Time Lapse“-Analyse:

36 h nach Transfektion wurden 20.000 bis 40.000 der transfizierten sowie der Kontrollzellen in eine mit Kollagen beschichtete 6-Loch-Platte umgesetzt. Diese Zellen wurden über Nacht mit dem Zeiss Cell Observer® Fluoreszenz Mikroskop beobachtet und gefilmt. Dieses Mikroskop ist von einem Zellinkubator umgeben, der für einen gewissen Zeitraum die normalen Brutschrankgegebenheiten (37°C, 5% CO₂) simulieren kann. Die Zellen wurden bei ihren Bewegungen für 20 h beobachtet. Mithilfe der Mikroskop-Software wurde dabei von jeder Probe in Intervallen von 10 min ein Bild aufgenommen. Diese Bilder (n = 121) wurden am Ende zu einem Videofilm vereinigt, der mithilfe der Open Source-Software „Time Lapse Analyzer“ (Huth et al. 2011) ausgewertet wurde.

b) „Wound Healing“- Assays:

Für Wundheilungs-Experimente wurden die transfizierten Zellen in Zelldichten von 150.000 bis 200.000 Zellen in 6-Loch-Platten umgesetzt, um einen konfluenten Zellrasen zu erhalten. Dieser wurde anschließend mit einer 200 µl-Pipettenspitze von oben nach unten durchgezogen. Die so geschaffene Wunde von 1-2 mm im Zellrasen wurde durch einen Waschschrift mit 1x PBS von abgelösten und toten Zellen befreit und anschließend wieder mit Vollmedium überschichtet. Die Analyse erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie bei den „Time Lapse“-Assays.

c) „Boyden Chamber“-Assays:

Für die Boyden-Kammer-Versuche wurden in Multiwell Primaria 24-Loch-Platten Inserts eingesetzt, deren Unterseiten aus Membranen mit 8 µm Porengröße (BD Biosciences, Heidelberg) bestanden. 20.000 bis 30.000 der zu untersuchenden Zellen wurden 24 h nach der Transfektion in serumfreiem DMEM in die Inserts ausgesät. Die Vertiefungen der Primaria-Platten enthielten DMEM mit 1 % FBS, wodurch ein Serumgradient zwischen der unteren und oberen Kammer entstand, der als Chemoattraktant für die Zellen diente. Die Boyden-Kammer-Platten wurden für 4 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, die sich auf der Unterseite der Membran befanden mit eiskaltem Methanol fixiert (10 min, RT), um sie im nächsten

Schritt mit Krystallviolett (0,2 % in 20 % Methanol; 10 min, RT) anzufärben. Die übrigen Zellen im Inneren des Inserts wurden mit einem Wattestäbchen entfernt. Nach 2 Waschschritten wurden die Inserts an der Raumluft getrocknet und anschließend bei 40-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop fotografiert. Die Bilder der gefärbten Zellen wurden zum einen mit bloßem Auge unter Verwendung der Open Source-Software „Image J“ (rsbweb.nih.gov/ij/) als Markierungshilfe ausgezählt. Des Weiteren wurde erneut die Software Time Lapse Analyzer zur automatisierten Auswertung verwendet.

3.4.2.7 Herstellung & Selektion stabil transfizierter CFL1-Klone

Das zuvor klonierte shRNAmir-CFL1-pTRIPZ-Konstrukt (im Folgenden CFL1-pTRIPZ) wurde mithilfe des Protokolls und des Reagenz Effectene® der Firma Qiagen in SUI2-007-Zellen in 6-Loch-Platten transfiziert. Nach 24 h wurden die transfizierte Zellpopulation sowie eine unbehandelte Kontrollpopulation auf 10 cm-Zellkulturschalen in verschiedenen Verdünnungen (1:2, 1:4, 1:8 & 1:16) umgesetzt. Weitere 24 h später erfolgte der Wechsel von Vollmedium auf Selektionsmedium (DMEM + FBS 10 % + 0,05 mg / ml Gentamicin + 1 µg / ml Puromycin). Alle Zellen, die das Repressionskonstrukt stabil in ihr Genom integriert hatten, besaßen im Zuge dessen auch die Antibiotika-Resistenz gegen Puromycin und überlebten somit den Selektionsprozess. Im Laufe von 7-10 Tagen unter Selektionsmedium starben die restlichen, untransfizierten Zellen und die übrig gebliebenen Zellen bildeten Kolonien ausgehend von Einzelzellen. Nachdem diese Kolonien eine adäquate Größe erreicht hatten, wurden sie voneinander getrennt in 6-Loch-Platten überführt und von dort aus weiter expandiert. Sobald die Zellen in ausreichender Menge vorhanden waren, wurden sie mit Doxycyclin-haltigem Medium induziert (DMEM + FBS 10 % + 0,05 mg / ml Gentamycin + 1 µg / ml Puromycin + 2 µg / ml Doxycyclin). 72 h nach dieser Behandlung erfolgte dann eine RNA-Isolation und die Bestimmung der CFL1-Expression mithilfe der qRT-PCR. Die ermittelte Expression wurde mit dem CFL1-Level der uninduzierten Population und dem der ursprünglichen S2-007-Zellen verglichen. Durch diesen Prozess konnten letztendlich 3 Zellklone ausgewählt werden, in denen durch die Doxycyclin-Induktion eine adäquate Repression induziert werden konnte. Diese wurden für die Weiterkultivierung und die funktionellen Assays ausgewählt, die restlichen Klone wurden verworfen.

3.4.2.8 Funktionelle Experimente mit stabil-transfizierten Klonen

Mit den verschiedenen Zelllinien wurden BrdU-Assays durchgeführt (Protokoll vgl. Kap. 3.4.2.2), um die Funktionalität der Repression zu überprüfen. Dafür wurden 2.500 Zellen / Vertiefung in eine ViewPlate 96-Loch-Platte ausgesät (3x für eigentliche Messung, 1x als Hintergrund). Es erfolgte eine Doxycyclin-Induktion in der Platte für 72 h im Vergleich zu uninduzierten Proben. Als weitere Kontrollen dienten unbehandelte S2-007-Zellen sowie Doxycyclin-behandelte S2-007-Zellen, um einen unspezifischen Effekt der Doxycyclin-Behandlung ausschließen zu können. Parallel zu diesem Versuch wurden auch Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät (100.000 Zellen / Vertiefung), um sowohl eine RNA- als auch eine Protein-Isolation als Repressionskontrolle durchführen zu können. Die Zellen für die RNA-Präparation wurden nach einer 48-stündigen Inkubationszeit geerntet, die Zellen zur Herstellung von Protein-Lysaten nach 72 h. Ebenfalls nach 72 h wurden die BrdU-Assays durchgeführt. Bei den CFL1-pTRIPZ-transfizierten Zellen konnte die Induktions-Effizienz bereits nach 24 h mit dem Fluoreszenzmikroskop überprüft werden, da dieser Vektor zusätzlich zum shRNA-Konstrukt ein rot-fluoreszierendes Konstrukt beinhaltet.

3.4.3 Tierexperimentelle Untersuchungen

Für die Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen in dieser Arbeit wurden die Richtlinien und die Protokolle der Ethikkommission der Universität Marburg eingehalten. Die Versuche wurden in athymischen Nacktmäusen vom Stamm nu / nu (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) durchgeführt. Hierzu wurden den Tieren jeweils 2×10^6 Zellen subkutan in die rechte Flanke injiziert. Nach Etablierung der Tumore erfolgte zur Induktion des in den Zellen beinhalteten Konstrukts bei der Hälfte der Tiere eine Verabreichung von Doxycyclin über das Trinkwasser (Konzentration: 2 mg / ml + 2 % Succrose). Die restlichen Tiere dienten als uninduzierte Kontrollgruppe und wurden mit normalem Wasser getränkt. Nach 7 Tagen hatten alle Versuchstiere Tumore in der Flanke etabliert. Zur Vermessung wurden die Tiere markiert und die Tumurlänge und -breite dokumentiert. Die Messung sowie ein Trinkwasser-Wechsel erfolgten 2-mal wöchentlich. Hatten die Tumore eine Größe von 1 x 1 cm überschritten, erfolgte die Opferung der Tiere mittels zervikaler Dislokation. Die Tumore wurden anschließend erneut vermessen, aus der Flanke isoliert und das Gewicht ermittelt. Nachdem diese Dokumentation abgeschlossen war, wurde der Tumor geteilt, wobei eine Hälfte für spätere RNA- und Proteinanalysen in flüssigem Stickstoff

schockgefroren und bei -80°C gelagert wurde. Die andere Hälfte wurde über Nacht in Formaldehyd verwahrt (4°C) und am nächsten Tag mithilfe der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100%) entwässert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Gewebe über Nacht in Methylbenzoat. Zuletzt wurden die Proben für 10 min in Xylol überführt, bevor sie in Paraffin eingebettet werden konnten.

3.4.4 Immunologische Methoden

3.4.4.1 Western Blot Analysen

a) Isolation und Bestimmung des Gesamtproteins:

Zwischen 40 und 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen im Vollmedium mithilfe eines Zellschabers vom Boden der 6-Loch-Platte abgelöst. Die Zellsuspension wurde in 5 min bei 13.000 rpm, RT zentrifugiert. Die entstandenen Zellpellets wurden mit PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation getrocknet. Die Zellen wurden je nach Pelletgröße in 150-250 μl PBS, versetzt mit einem Proteinase-Inhibitor (1:100), resuspendiert und im Folgenden mit einer Ultraschall-Sonde mechanisch aufgeschlossen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford 1976). 1-2 μl der zu messenden Proben wurden mit 150 μl Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent versetzt. Des Weiteren wurde für die Coomassie-Lösung eine Eichgerade erstellt, indem sie mit definierten Mengen von Rinderserumalbumin (BSA; 1-10 μg / ml) versetzt wurde. Es erfolgte eine Messung im Multiskan FC Photometer bei 595 nm, dem Absorptionsmaximum der Coomassie-Lösung, wenn sie mit Proteinen komplexiert wird. Anhand der Eichgeraden konnten im Anschluss die Proteinkonzentrationen der Proben errechnet werden.

b) SDS-Gelelektrophorese:

Die Analyse der extrahierten Proteine erfolgte mittels der SDS-PAGE (**S**odium-**D**odecyl-**S**ulfat-**P**olyacrylamid-**G**elelektrophorese). Dabei werden durch ein unter Spannung stehendes Polyacrylamid-Gel die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Zunächst müssen die Proteine linearisiert und ihre Eigenladung maskiert werden. Dazu wurden je 50 μl der Probe mit 16 μl 4x-SDS-Probenpuffer (Rezept siehe unten) sowie 7 μl DTT (**D**ithiothreitol) versetzt und bei 95°C für 5 min erhitzt. Durch das Erhitzen wird zunächst die Quartärstruktur der Proteine aufgebrochen, das DTT sorgt für ein

Aufbrechen von gegebenenfalls vorhandenen Disulfidbrücken. An die linearisierten Proteine lagert sich das SDS an, wodurch diese generell negativ geladen sind. Die so behandelten Proben können in die Taschen des Gels geladen werden, welches nach folgendem Rezept hergestellt wurde:

Tabelle 27: Ansatz für 2 Gele

| Trenngel | | | Sammelgel | |
|------------------|-----------|-----------|------------------------------|-------|
| Reagenz | 10 %-Gele | 15 %-Gele | Reagenz | Menge |
| Trenngelpuffer | 3 ml | 3 ml | „fertige“ Sammelgellösung | 4 ml |
| H ₂ O | 4,4 ml | 2,4 ml | 10 % APS | 10 µl |
| Acrylamid-Lsg. | 4,0 ml | 6,0 ml | TEMED | 10 µl |
| Glycerol | 0,6 ml | 0,6 ml | | |
| 10 % APS | 20 µl | 20 µl | | |
| TEMED | 20 µl | 20 µl | | |

Nach einer ca. 1-stündigen Polymerisation der Gele wurden diese in die Gelkammer eingebaut, welche mit 1 x SDS-Laufpuffer (Rezept s. u.) aufgefüllt wurde. Von den Proben wurden jeweils 10 bis 15 ng in die Taschen geladen und eine konstante Spannung von 120 V angelegt. Hatten die Banden die Trenngelgrenze erreicht, wurde die Spannung bis zum Ende des Gellaufs auf 200 V erhöht. Im Trenngel wurden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt, sie wandern durch ihre Ladung von der Kathode zur Anode, wobei kleine Proteine schneller wandern als große.

Tabelle 28: Ansatz für 10x SDS-Laufpuffer

| Reagenz | Menge |
|--|-----------------------|
| Tris Base | 250 mM (30,3 g / 1 L) |
| Glycin | 1,92 M (144 g / 1 L) |
| SDS | 1 % (10 g / 1 L) |
| Für 1x mit H ₂ O 1:10 verdünnen | |

Tabelle 29: weitere Lösungen und Puffer

| Reagenz | Menge | Reagenz | Menge |
|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| <u>Stopp-Gel</u> | | <u>Sammelgelpuffer</u> | |
| „fertige“ Trenngellösung | 300 µl | Tris Base | 0,5 M (12,11 g / 200 ml) |
| 10 % APS | 3 µl | SDS | 0,4 % (4 ml, 20 %ig) |
| TEMED | 3 µl | pH 6,8 einstellen | |
| <u>Trenngelpuffer</u> | | <u>SDS-Probenpuffer 4x</u> | |
| Tris Base | 1,5 M (36,34 g / 200 ml) | Tris HCl | 2g |
| SDS | 0,4% (4 ml, 20 %ig) | Bromphenolblau | 25 mg |
| pH 8,8 einstellen | | A-dest | 25 ml |
| | | Mit Glycerol auf 45 ml auffüllen | |
| <u>fertige Sammelgellösung</u> | | pH 6,8 einstellen | |
| Sammelgelpuffer | 25 ml | SDS-Lösung (20 %) | 5 ml |
| A-dest | 59 ml | | |
| Acrylamid (30% / 0,8%) | 16 ml | | |
| Bei 4°C lagern | | | |

c) Transfer von Proteinen und Immunoblotting:

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden anschließend mittels des Tank-Blot-Verfahrens auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Blotting-Apparatur wurde dabei nach dem gängigen Schema aufgebaut (Burnette 1981, Towbin et al. 1979). An die mit Blotting-Puffer (Rezept s. Folgeseite) gefüllte Apparatur wurde ein weiteres elektrisches Feld mit einer Spannung von 300 mA senkrecht zum Feld der SDS-PAGE angelegt, wodurch die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen wurden. Die Laufdauer richtete sich dabei nach der Größe des zu untersuchenden Proteins. Nach dem Transfer wurde dessen Erfolg durch eine 5-minütige Inkubation der Membran in Ponceau S-Reagenz überprüft.

Tabelle 30: verwendete Pufferlösungen

| Reagenz | Menge |
|-------------------------------------|-----------------------|
| <u>Blottingpuffer 10x</u> | |
| Tris Base | 250 mM (30,3 g / 1 L) |
| Glycin | 1,92 M (144 g / 1 L) |
| <u>Blottingpuffer 1x</u> | |
| Blottingpuffer 10x | 100 ml |
| Methanol | 200 ml |
| A-dest | 700 ml |
| bei 4°C lagern | |
| TBS 10x vgl. Kapitel 3.2.6, Tab. 23 | |
| <u>TBS-T 1x</u> | |
| TBS (10x) | 100 ml |
| A-dest | 900 ml |
| Tween® 20 | 1 ml |

Zur weiteren Analyse wurden die Membranen zunächst für 2-4 h auf einem Kippschüttler in 5 % Milchpulver in TBS-T (0,1 %; ab hier Blockingpuffer, Rezept s. o.) bei 4°C inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu verhindern. Über Nacht wurde dann der jeweilige Erstantikörper zugegeben. Eine Übersicht der verwendeten Erstantikörper befindet sich in Tabelle 13, Kap. 2.9.

Um ungebundene Antikörper-Reste zu entfernen, wurde die Membran am nächsten Tag vier Mal für jeweils 10 min mit TBS-T (0,1 %) gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Antikörper (HRP, engl. Horseradish Peroxidase, vgl. Tab. 14, Kap. 2.9) verwendet, der gegen den verwendeten Erstantikörper gerichtet ist. Es erfolgte eine Inkubation für 1-2 h bei 4°C in Blockingpuffer. Nach erneutem, 4-maligem Waschen der Membran erfolgte die Detektion der Proteine mithilfe des Enhanced Chemoluminescence Reagenz (ECL). Das emittierte Licht wurde abschließend mit der Chemocam der Firma Intas detektiert und fotografiert.

3.4.5 Statistische Auswertung

Für alle numerischen Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängig reproduzierten Experimenten wurden die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen (SD) berechnet. Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde ein einseitiger, ungepaarter Student's T-test verwendet. Dabei wurde ein Wert von $p < 0,05$ als signifikant (*) und $p < 0,01$ als hoch signifikant (**) betrachtet.

4 ERGEBNISSE

4.1 PARALLELISIERTE CHARAKTERISIERUNG

4.1.1 Etablierung der „Reverse Transfection“-Methode

a) Optimierung der Spotting-Parameter:

Bevor ein serielles Spotting mit dem Tecan Miniprep 75 Roboter stattfinden konnte, musste zunächst eine Optimierung des Protokolls mittels mehrerer Testläufe erfolgen. Hierbei galt es, die Gelatine-Konzentration auf einen Wert einzustellen, bei dem präzise abgegrenzte und auf allen 15 Slides gleich große Spots generiert werden konnten. Außerdem musste die Transfektionseffizienz durch Anpassung der DNA-Konzentration optimiert werden.

Die Gelatine-Konzentration wurde auf Basis der Testreihen auf 0,2 % eingestellt. Dadurch konnten die oben genannten Kriterien am Besten sichergestellt werden. In weiteren Testreihen zeigte sich, dass eine DNA-Konzentration von 4 µg im Spotting-Ansatz zu den besten Resultaten führte. Mit dieser Menge ergaben sich für die meisten der Fusionsproteine annehmbare Transfektionseffizienzen von über 50 % der Zellen auf einem Spot, während mit sinkendem DNA-Einsatz auch die Effizienzen abnahmen. Höhere Konzentrationen führten dagegen nicht mehr zu einem nennenswerten Anstieg der transfizierten Zellen, sondern zeigten in der Zellpopulation eine zunehmende Zahl toter Zellen im Bereich der Spots, wodurch die Konzentration von 4 µg für die Folgeexperimente festgeschrieben wurde.

b) Qualitätsbewertung der Microarray-Slides und der Transfektions-Effizienzen:

Bevor die Zellen auf die Microarrays ausgesät wurden, erfolgte eine Vorsortierung der Slides. Es wurden nur solche für die Hochdurchsatz-Analysen ausgewählt, die die drei folgenden Kriterien erfüllten:

- a) die Spots sind präzise von einander abgegrenzt
- b) mindestens 50 von 80 Spots sind sauber gespottet
- c) der Spot-Durchmesser ist > 0,5 mm

Nach Trocknung der Slides, sowie Inkubation und Fixierung der Zellen wurden die „Live Cell Microarrays“ bezüglich ihrer Transfektionseffizienz bewertet. In Abbildung 5

sind Beispiele für unterschiedlich gute Effizienzen dargestellt. Zunächst wird für das MarvelD1-Gen sowohl das CFP- (A) als auch das YFP-Konstrukt (B) dargestellt. Beide zeigten eine annehmbare Transfektionseffizienz, wobei diese in HEK-293-Zellen (YFP-Kanal) höher war als in PANC-1-Zellen. Die Beispiele für ATF3-CFP (C) und EDNRA-YFP (D) zeigen dagegen Spots mit schwachen Transfektionseffizienzen. Hier zeigten nur einzelne Zellen ein Fluoreszenzsignal, wodurch die Auswertung erschwert wurde.

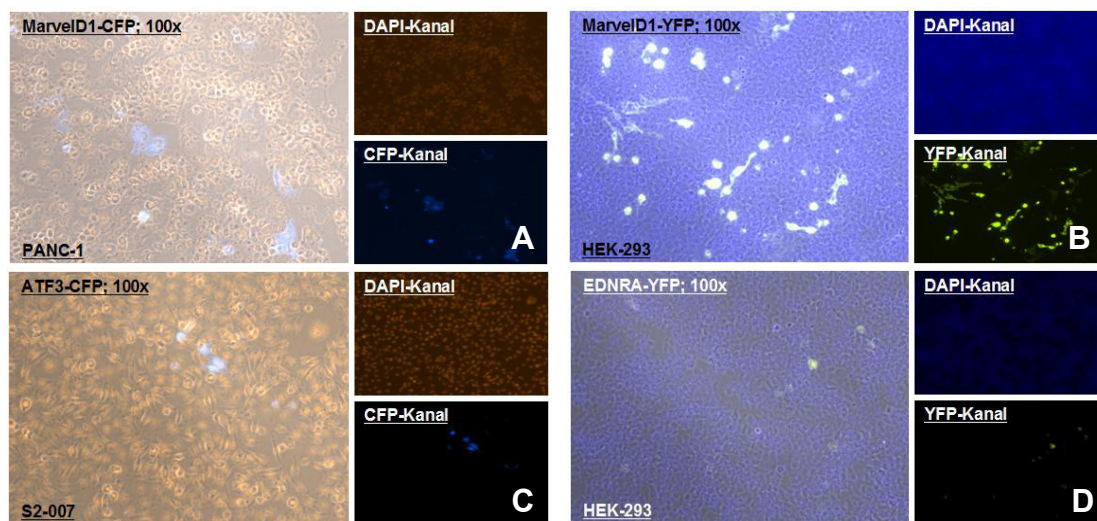


Abbildung 5: Beispiele für verschiedene Transfektionseffizienzen auf den „Live Cell Microarrays“. Gezeigt werden verschiedene Fluoreszenzkonstrukte sowohl für den CFP- als auch den YFP-Kanal. Neben den Überlagerungsbildern aus Durchlicht-, DAPI- und Fluoreszenz-Kanal werden die Fluoreszenzsignale noch einmal gesondert dargestellt (kleine Bilder, DAPI-Kanal oben, CFP bzw. YFP-Kanal unten). Während CFP- und YFP-Kanal in ihren zugehörigen Farben blau und grün dargestellt werden, wurde bei der Farbe des DAPI-Kanals zur Vermeidung von farblichen Überlagerungen zwischen braun und blau gewechselt. **Hohe Effizienz:** A) MarvelD1-CFP, 100x, PANC-1; B) MarvelD1-YFP, 100x, HEK-293. **Niedrige Effizienz:** C) ATF3-CFP, 100x, S2-007; D) EDNRA-YFP, 100x, HEK-293.

c) Abgrenzung von Artefakten:

Eine weitere Schwierigkeit bei der Auswertung der „Live Cell Microarrays“ stellten Artefakte dar. Dabei musste zwischen solchen des Slides und intrazellulären Artefakten unterschieden werden. In Abbildung 6 **A** erkennt man eine große Luftblase, die beim Eindeckeln des Slides entstanden ist und die Auswertung erschwert (s. Folgeseite). Die Bilder in **B-D** zeigen intrazelluläre Artefakte. Die Transfektion mit BCKD-YFP führte in den Zellen häufig zu stäbchenförmigen Fluoreszenzsignalen, die im CFP-Konstrukt dieses Gens nicht zu sehen waren. Die Abbildungen **C** und **D** zeigen zwei Beispiele für Membran-lokalisierte Genprodukte. Bei diesen Kandidaten zeigte

sich häufig eine Art Blasenbildung der Membran, wie in der 200-fachen Vergrößerung deutlich wird. Da dieses Phänomen nicht auf jedem Slide reproduziert werden konnte und auch nicht alle Membran-lokalisierten Konstrukte die Blasen aufwiesen, wurde dieses Phänomen als Artefakt klassifiziert.

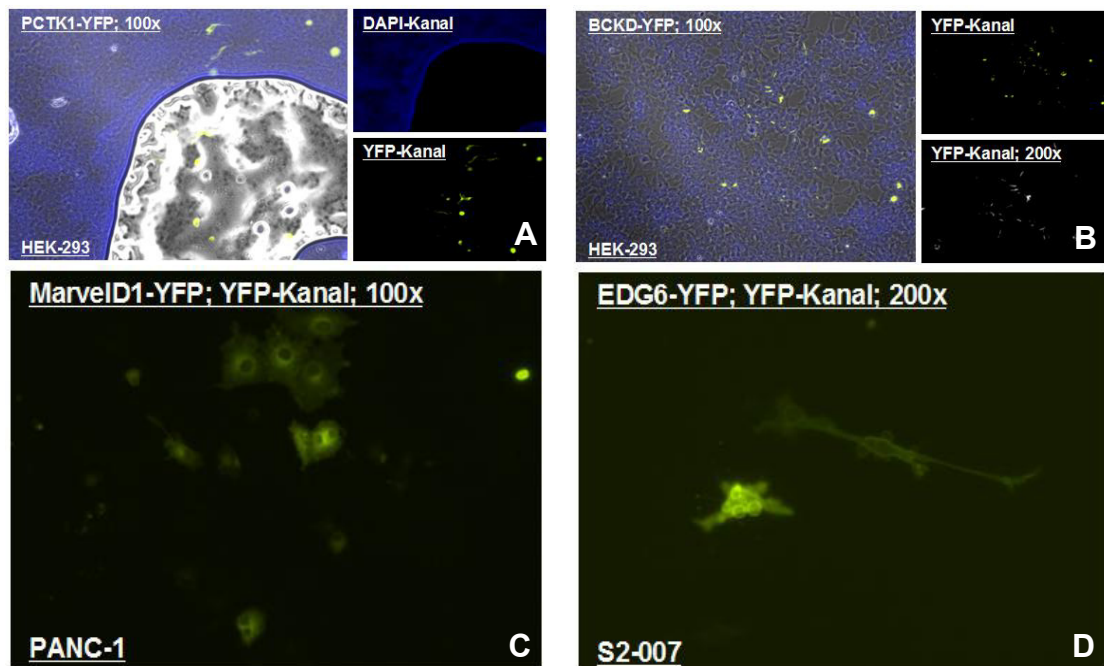


Abbildung 6: Beispiele für verschiedene Artefakte auf den „Live Cell Microarrays“. Gezeigt werden verschiedene Fluoreszenzkonstrukte im YFP-Kanal. Die großen Bilder in **A** und **B** zeigen ein Überlagerungsbild aus Durchlicht-, DAPI- und Fluoreszenz-Kanal, die beiden zugehörigen kleinen Bilder zeigen jeweils den DAPI- bzw. YFP-Kanal. In **C** und **D** wird nur der YFP-Kanal in 2 verschiedenen Vergrößerungen dargestellt. YFP: grün; DAPI: blau. **A)** Luftblase: PCTK1-YFP, 100x, HEK-293. **intrazelluläre Artefakte:** **B)** „Stäbchen-Bildung“: BCKD-YFP, 100x, HEK-293; **C)** Blasenbildung: MarvelD1-YFP, 100x, PANC-1; **D)** Blasenbildung: EDG6-YFP, 200x, S2-007.

4.1.2 Dokumentation der subzellulären Lokalisation

Im ersten Schritt der parallelisierten Analyse wurden die „Live Cell Microarrays“ mit den überexprimierten Kandidatengenen genutzt, um die subzellulären Lokalisationen der unterschiedlichen Genprodukte zu bestimmen. Es ist zu erwähnen, dass es sich bei der parallelisierten Analyse der Kandidatengene um ein Gemeinschaftsprojekt handelte, wodurch ein Teil der Analysen von Tatjana Honstein (Doktorandin AG Buchholz) durchgeführt wurden.

Jede Spotposition des Arrays wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop angefahren, um dort Mehrkanalaufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen durchzuführen. Zunächst

erfolgte immer eine Aufnahme in 100-facher Vergrößerung, bei der der CFP- bzw. der YFP-Kanal, der DAPI-Kanal für die Nukleus-Färbung sowie der Durchlichtkanal berücksichtigt wurden. Durch diese Übersichtsaufnahme konnte ein erster Eindruck der Transfektionseffizienz sowie der subzellulären Lokalisation gewonnen werden (vgl. Abbildung 5 B (s. o.)). Des Weiteren wurden von einzelnen transfizierten Zellen weitere Aufnahmen sowohl in 200-facher als auch in 630-facher Vergrößerung durchgeführt, um einen detaillierten Einblick in die Lokalisation der Genprodukte zu erhalten. Gleichzeitig konnten im Zuge dieser Analysen durch die Transfektion bedingte, morphologische Veränderungen der Zellen festgestellt werden. Die anschließende Evaluation dieser Daten für die einzelnen Kandidatengene führte bezüglich der subzellulären Lokalisation zu einer Einteilung in die folgenden 5 verschiedenen Hauptkategorien:

- a) Lokalisation ausschließlich im Zytoplasma (CP)
- b) Lokalisation ausschließlich im Nukleus (NUC)
- c) ubiquitäre Verteilung auf Zytoplasma und Nukleus (CP / NUC)
- d) Lokalisation in Zellorganellen / Vesikeln (Orgs)
- e) membranständige Lokalisation (Mem)

Die Abbildung 7 zeigt exemplarische Bilder für die jeweiligen Kategorien in verschiedenen Zelllinien (s. Folgeseite). Das Fusionsprotein von Survivin-CFP wurde zum Beispiel ausschließlich im Zytoplasma vorgefunden (**A**), während H1FO-YFP eine nukleäre Lokalisation aufwies (**B**). Es gab aber auch viele Kandidatengene, deren Produkte gleichmäßig in der gesamten Zelle lokalisiert waren, wie es hier exemplarisch für LGALS4-YFP dargestellt ist (**C**). An dieser Stelle ist anzumerken, dass sich relativ häufig auch eine Vermischung der Kategorien ergab. So konnte es auf einem Spot Zellen mit verschiedenen Lokalisationen geben. Beispielsweise gab es Kandidatengene, deren Genprodukte in einer Zelle zytoplasmatisch lokalisiert waren, während die direkt benachbarte Zelle auf dem gleichen Spot eine Nukleus-Lokalisation zeigte. Meist zeigten sich dabei auf diesen Spots zusätzliche Zellen, in denen das Genprodukt ubiquitär verteilt war. Solche Mischkategorien wurden bei der Dokumentation der Lokalisation ebenfalls vermerkt. Beispiele für die beiden letzten Kategorien „Organellen“ und „Membran“ zeigen die Bilder der Kandidaten RABAC1-YFP (**D**) und TM4SF1-YFP (**E**).

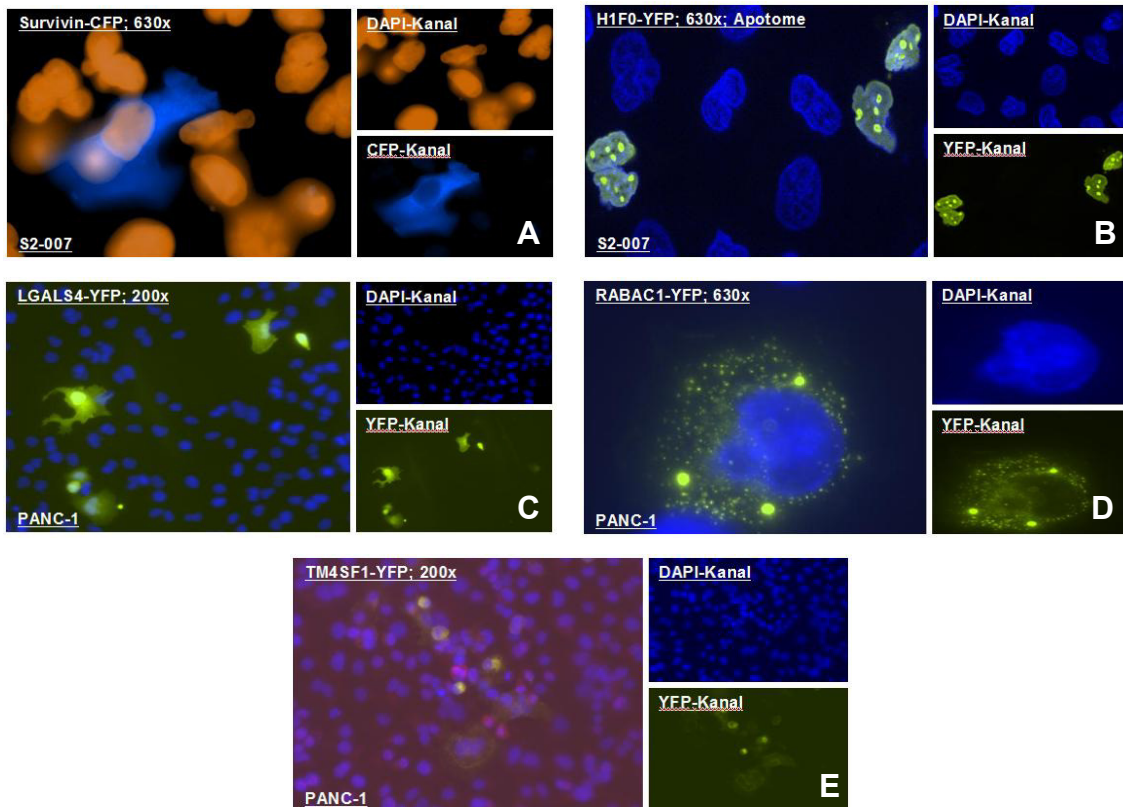


Abbildung 7: Beispielhafte Darstellung der 5 verschiedenen Hauptkategorien der subzellulären Lokalisation. Gezeigt werden verschiedene Überlagerungsbilder der Fluoreszenzkonstrukte transfiziert in verschiedene Zelllinien, sowie Einzelbilder des DAPI- bzw. YFP-Kanals. CFP: blau; YFP: grün; DAPI: braun bzw. blau. **A) Zytoplasma-Lokalisation:** Survivin-CFP, 630x, S2-007. **B) Nukleus-Lokalisation:** H1FO-YFP, 630x, S2-007. **C) zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation:** LGALS4-YFP, 200x, PANC-1. **D) Organell/Vesikel-Lokalisation:** RABAC1-YFP, 630x, PANC-1. **E) Membran-Lokalisation:** TM4SF1-YFP, 200x, PANC-1.

Eine detaillierte Übersicht der ermittelten subzellulären Lokalisationen sowie gegebenenfalls vorhandene Auffälligkeiten bezüglich der allgemeinen Zellmorphologie findet sich für die drei verschiedenen Zelllinien HEK-293, PANC-1 und S2-007 im Anhang (Kap. 7.2.2, Tabellen 43-46, s. S. 137 ff).

Nachdem die Daten für alle Kandidatengene gesammelt und erfolgreich reproduziert wurden, erfolgte eine erste Analyse des Datensatzes. Dabei wurden untersucht, ob es bezüglich der Lokalisation der Kandidatengene Unterschiede in folgenden Kategorien gab:

- a) transformierte versus nicht-transformierte Zellen
- b) FBS 10 % versus FBS 0 %
- c) CFP- versus YFP-Kanal

Die Tabelle 31 zeigt die 9 Gene, die bezüglich dieser 3 Kategorien die deutlichsten Unterschiede in der subzellulären Lokalisation der Genprodukte gezeigt haben. Wie bereits im Methodenteil beschrieben, wurden die einzelnen Ergebnisse mit einem 3-stufigen System bewertet ($++ = n \geq 3$; $+ = 1 \leq n \leq 3$, $(+) = n: 1-2$ oder undeutlich; vgl. Kap 3.3.1).

Tabelle 31: Zusammenfassung der stärksten Effekte bezüglich der subzellulären Lokalisation. Gezeigt werden die 9 Gene, die nach der Überexpression der Kandidatengene die auffälligsten Lokalisationsveränderungen aufgewiesen haben. Untersucht wurden die 3 Kategorien „HEK-293- vs. transformierte Zellen“, „FBS 10 % vs. 0 %“ und „CFP vs. YFP“.

| Gen | Lokalisation | | |
|---------|-----------------|------------------|-------------|
| | HEK vs. Transf. | FBS 10 % vs. 0 % | CFP vs. YFP |
| CCL14 | | ++ | |
| FASTK | | ++ | + |
| NFATC1 | | ++ | |
| PCTK1 | | ++ | |
| PPP2R1A | + | ++ | |
| FRA2 | ++ | ++ | |
| GTF2F2 | ++ | + | |
| CCDN1 | ++ | ++ | |
| PAI-1 | + | ++ | ++ |

$++ = n \geq 3$; $+ = 1 \leq n \leq 3$.

Bei den Genen CCL 14, NFATC1 und PCTK1 ergaben sich wechselnde subzelluläre Lokalisationen in Abhängigkeit des Serumgehalts. Dieser Effekt konnte weiterhin bei den Kandidaten FASTK, PPP2R1A, FRA2, GTF2F2, CCDN1 und PAI-1 beobachtet werden, allerdings zeigten sich für diese Gene zusätzliche Effekte in mindestens einer der beiden anderen Kategorien. PAI-1 zeigte beispielsweise noch eine Veränderung der subzellulären Lokalisation in Abhängigkeit des Fluoreszenzkonstrukts, während CCDN1 starke Unterschiede zwischen den Karzinomzellen und den nicht-transformierten HEK-293-Zellen aufwies. Die Ergebnisse der übrigen 69 Kandidatengene sind im Anhang in Tabelle 46 aufgelistet.

4.1.3 Funktionelle Charakterisierung der Kandidatengene mithilfe von immunzytologischen Analysen

Im zweiten Schritt der Analyse wurden die „Live Cell Microarrays“ für eine weitere Charakterisierung der Kandidatengene mit verschiedenen immunzytologischen Antikörpern behandelt, um potentielle Effekte der Überexpression auf verschiedene

Zellfunktionen zu ermitteln (vgl. Tab. 22, S. 36). Um mögliche Proliferationseffekte aufzudecken, wurde ein Ki67- sowie ein Cyclin B1-Antikörper verwendet, während mittels eines Caspase-3-Antikörpers apoptotische Einflüsse untersucht wurden. Potentielle Effekte auf die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) wurden mithilfe von Vimentin- und E-Cadherin-Antikörperfärbungen ermittelt. Um die Effekte im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, wurde ein Sekundärantikörper verwendet, der ein Fluoreszenzsignal im Cy3-Kanal erzeugt. Dadurch konnte eine Überlagerung mit den Signalen der Fluoreszenzkonstrukte im CFP- bzw. YFP-Kanal verhindert werden. Im Rahmen des Gemeinschaftsprojekts wurden die Vimentin-, E-Cadherin- und Cyclin B1-Analysen von Tatjana Honstein durchgeführt.

Auch in diesem Teil der Analyse wurden von jedem Spot des Microarrays mehrkanalige Fluoreszenzaufnahmen getätigt (vgl. Kap. 4.1.2). Anschließend wurden die Transfektionssignale mit den Antikörpersignalen verglichen, um gegebenenfalls vorhandene Korrelationen aufzudecken. Die Abbildungen 8-10 zeigen Beispiele für die verschiedenen Antikörper. Wie auch bei der Lokalisations-Analyse wurden Überlagerungsbilder mit verschiedenen Fluoreszenz-Kanälen angefertigt. Gezeigt wird je ein Beispiel für die 5 verschiedenen Assays. Bei den großen Bildern handelt es sich dabei um Mehrkanal-Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen und Zelllinien. Die zugehörigen kleineren Bilder schlüsseln jeweils den Transfektions- (CFP bzw. YFP) sowie den Cy3-Kanal mit dem Antikörper-Signal auf.

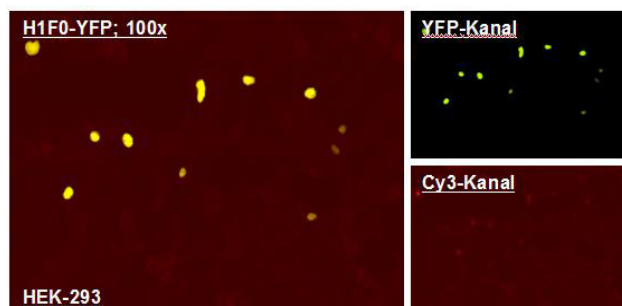


Abbildung 8: Dokumentation der Caspase3-Signale nach Überexpression des H1F0-YFP-Konstrukts in HEK-293-Zellen. Das große Bild zeigt eine Mehrkanal-Aufnahme des YFP- sowie des Cy3-Kanals in 100-facher Vergrößerung. Der YFP-Kanal verdeutlicht die nukleäre Lokalisation dieses Kandidatengens. Die Signale des Caspase3-Antikörpers, dessen Signale laut Herstellerprotokoll ebenfalls im Nukleus lokalisiert sind, korrelieren mit denen des YFP-Kanals, wodurch hier ein apoptotischer Effekt der Überexpression angenommen werden kann. **YFP:** grün; **Cy3:** rot.

Die oben gezeigte Abbildung 8 zeigt HEK-293-Zellen, die sich auf dem H1F0-Spot abgesetzt haben und dort mit dem YFP-Konstrukt transfiziert wurden. Der YFP-Kanal

zeigte eine deutliche Kernlokalisierung für das entstandene Genprodukt (Bild oben rechts). Nachdem eine Behandlung des Slides mit dem Caspase3-Antikörpers erfolgt war, zeigten sich zusätzlich Signale im Cy3-Kanal (Bild rechts unten). Man erkennt eine Korrelation zwischen den Transfektionssignalen und denen des Antikörpers, die auf eine mögliche Apoptose-Induktion durch die Überexpression von H1F0 schließen lässt. Ein noch deutlicheres Bild zeigt sich bei der folgenden Aufnahme, bei der die Anwendung des Ki67-Antikörpers auf transfizierten HEK-293-Zellen eine klare Korrelation zwischen den Signalen (Abb. 9 A) zeigte. Die Genprodukte von NKX2-5-YFP zeigten im Vergleich zum DAPI-Kanal (blau) ebenfalls eine Nukleus-Lokalisation. Vergleich man das YFP-Signal nun mit der Aufnahme des Cy3-Kanals, so zeigte sich, dass die Antikörper-Signale eindeutig mit den Signalen der transfizierten Zellen übereinstimmten. Allerdings ist anzumerken, dass dieser Effekt für NKX2-5-YFP nicht durchgängig reproduzierbar war, wodurch diese Beobachtung in der Gesamtauswertung nur mit „(+)" gewertet wurde (vgl. Anhang, Tab. 50).

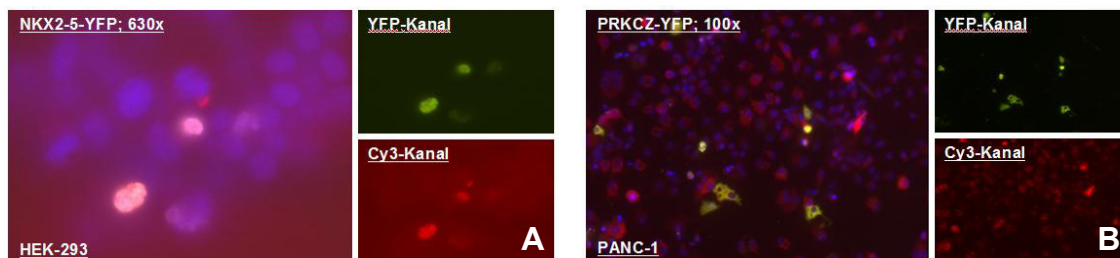


Abbildung 9: Beispiel-Aufnahmen für die verschiedenen Antikörper zur Analyse der Zellproliferation. **A:** NKX2-5-YFP transfiziert in HEK-293, behandelt mit dem Ki67-Antikörper (630-fache Vergrößerung). **B:** PRKCZ-YFP transfiziert in PANC-1, behandelt mit dem Cyclin B1-Antikörper (100-fache Vergrößerung). **Große Bilder:** Mehrkanal-Aufnahme kombiniert aus DAPI-Kanal (blau), YFP-Kanal (grün) und Cy3-Kanal (rot). **Kleine Bilder:** YFP-Kanal (oben); Cy3-Kanal (unten).

Die weiteren Abbildungen 9 B sowie 10 A und B (s. Folgeseite) zeigen exemplarische Beispielbilder für das Cyclin B1-Assay sowie die Differenzierungs-Experimente mit den Vimentin- und E-Cadherin-Antikörpern, die von Tatjana Honstein durchgeführt wurden. Auch hier zeigten sich Korrelationen zwischen den Fluoreszenz- und Antikörper-Signalen.

Während der Analyse der Lokalisationsdaten zeigten sich für S2-007-Zellen nur sehr schlechte Transfektionseffizienzen. Gleichzeitig ergab sich für diese Zelllinie auch eine generell hohe Quote an Totalausfällen von einzelnen Spots. Dadurch wurde ein Wiederfinden und Zuordnen der Spotpositionen erschwert. Aufgrund dieser Ergebnisse

wurden die immunzytologischen Färbungen außer für den Caspase-3-Antikörper nur für PANC-1- und HEK-293-Zellen durchgeführt.

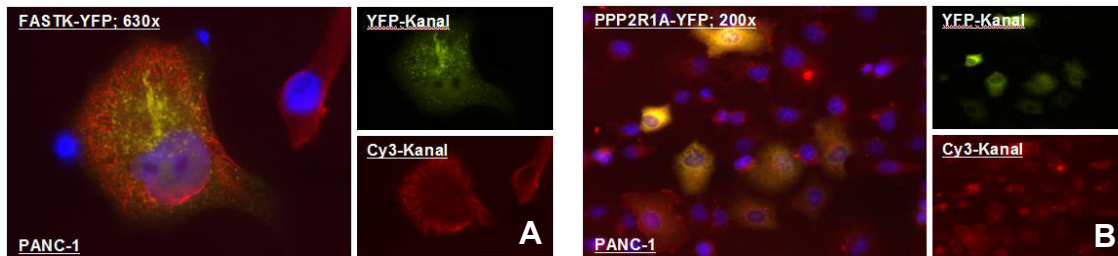


Abbildung 10: Exemplarische Dokumentation der Überexpressions-Effekte auf die Zelldifferenzierung. A: FASTK-YFP transfiziert in PANC-1, behandelt mit dem Vimentin-Antikörper (630-fache Vergrößerung). **B:** PPP2R1A-YFP transfiziert in PANC-1, behandelt mit dem E-Cadherin-Antikörper (200-fache Vergrößerung). **Große Bilder:** Mehrkanal-Aufnahme kombiniert aus DAPI-Kanal (blau), YFP-Kanal (grün) und Cy3-Kanal (rot). **Kleine Bilder:** YFP-Kanal (oben); Cy3-Kanal (unten).

Die Ergebnisse der funktionellen Analysen wurden analog zu den Lokalisationsdaten in einer Tabelle gesammelt und mit dem in Kapitel 3.3.1 beschriebenen System bewertet. Die gesammelten Daten für alle 79 Kandidatengene, die in den verschiedenen Zelllinien überexprimiert und anschließend mit den 5 Antikörpern behandelt wurden, ist im Anhang in den Tabellen 50 und 51 dargestellt.

4.1.4 Analyse der PaCaNet-Gene im „Forward Transfection“-Format

Die Analyse der später hinzugefügten Gene, die als zusätzliche Kandidaten aus dem NGFN-Kooperationsprojekt "PaCaNet" hervorgegangen waren, erfolgte nicht im „Reverse Transfection“-Format, sondern im „forward“-Format. Diese Tatsache ergab sich aus der niedrigen Anzahl an Genen. Bei 12 Genen hätte sich bei einer Analyse im CFP- und YFP-Kanal ein Array aus lediglich 24 Spots ergeben, so dass dieser Teil der Analyse nach dem gängigen Ablauf in Zellkulturplatten durchgeführt wurde. Für die Untersuchung mithilfe der Caspase3- und Ki67-Antikörper wurden die Transfektion und die immunzytologische Behandlung nach dem in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen auf Deckgläser in 24-Loch-Platten ausgesät und dort fixiert und behandelt, wodurch sich für die meisten Gene Transfektionseffizienzen zwischen 70-80% ergaben.

Es erfolgte auch hier eine Bestimmung der subzellulären Lokalisation. Die Daten für die 3 Zelllinien HEK-293, PANC-1 und S2-007 sind im Anhang in den Tabellen 47-49

aufgelistet. Diese Daten wurden wie auch für den reversen Ansatz bezüglich Veränderungen der Lokalisation untersucht. Die Resultate sind in Tabelle 32 dargestellt. Es zeigten sich 4 Gene, in denen die Lokalisation in den nicht-transformierten HEK-293-Zellen von der in den Karzinomzellen abweicht. Des Weiteren ergaben sich für jeweils 5 Gene Lokalisationsänderungen in Abhängigkeit vom FBS-Gehalt oder der Konstrukt-Variante.

Anschließend erfolgte auch in diesem Format eine Färbung mit den verschiedenen Antikörpern, wobei dies wie schon zuvor aus Effizienzgründen nur für die HEK-293- und PANC-1-Zellen durchgeführt wurde (vgl. Kap. 4.1.3). Das Auswertungs-Schema entsprach dem für die 79 Kandidatengene. Die für die einzelnen Gene ermittelten Signale sind in Tabelle 33 dargestellt (s. Folgeseite). Besonders für den Caspase-Antikörper konnten verschiedenste Signale ermittelt werden. Auch in diesem Versuchsteil wurden die Versuche mit den Antikörpern Cyclin B1, Vimentin und E-Cadherin von Tatjana Honstein durchgeführt. Auch diese Analysen wurden nach dem gleichen Schema wie oben ausgewertet und die Daten in die Tabelle aufgenommen.

Tabelle 32: Auswertung der Lokalisationsdaten für die 12 PaCaNet-Gene. Untersucht wurden wieder die 3 verschiedenen Kategorien bezüglich der subzellulären Lokalisation. Zusätzlich wurden auffällige Zellmorphologien erfasst.

| Gen | Lokalisation | | | Morphologie | |
|---------|-----------------|------------------|-------------|-------------|--------|
| | HEK vs. Transf. | FBS 10 % vs. 0 % | CFP vs. YFP | HEK-293 | PANC-1 |
| CDC20 | | ++ | | | |
| MAPRE2 | + | | + | | |
| PKM2 | + | + | | + | + |
| TSG101 | | | | | ++ |
| NT5E | | | | | + |
| EZH2 | + | ++ | | | |
| MRE11A | | | | | |
| SUV39H1 | | ++ | + | | + |
| RALB | | | ++ | | |
| SRPK1 | | | + | | |
| PRKCZ | | | | | ++ |
| RRAS | + | + | + | | + |

++ = $n \geq 3$; + = $1 \leq n \leq 3$.

Tabelle 33: Auswertung der funktionellen Daten bezüglich der 12 PaCaNet-Gene. Dargestellt sind die Ergebnisse der funktionellen Analysen mit den verschiedenen Antikörpern jeweils für die HEK-293- als auch die PANC-1-Zellen. Die Versuche wurden in Anwesenheit von FBS (10%) durchgeführt. Der Assay mit dem Caspase3-Antikörper wurde auch in Abwesenheit von FBS durchgeführt.

| Gen | Apoptose | | | | Proliferation | | | | Differenzierung / EMT | | | |
|---------|--------------------|--------|-------------------|--------|---------------|--------|-----------|--------|-----------------------|--------|------------|--------|
| | Casp3; FBS 10 % | | Casp3; FBS 0 % | | Ki67 | | Cyclin B1 | | Vimentin | | E-Cadherin | |
| | HEK-293 | PANC 1 | HEK-293 | PANC 1 | HEK-293 | PANC 1 | HEK-293 | PANC 1 | HEK-293 | PANC 1 | HEK-293 | PANC 1 |
| CDC20 | | | + | | | | | | | | | |
| MAPRE2 | | | | + | | | | | | | | |
| PKM2 | | | + | ++ | | | | | | ++ | | |
| TSG101 | | + | | | | | | | | | | |
| NT5E | | + | | | | | | | | | | |
| EZH2 | | | | | | | | | | | | |
| MRE11A | | | | + | | | | | | | | |
| SUV39H1 | ++ | ++ | | | | | | | | | | |
| RALB | | | | + | | | | | | | | + |
| SRPK1 | | | | | | | | | | | | |
| PRKCZ | + | | | ++ | | | | | | | | |
| RRAS | | | | | | | | | | | | |

++ = $n \geq 3$; + = $1 \leq n \leq 3$.

4.1.5 Validierung der reversen Transfektion

Nachdem die Dokumentation der subzellulären Lokalisation sowie deren funktionelle Charakterisierung sowohl nach Überexpression als auch nach Repression der Kandidatengene abgeschlossen waren, konnte eine erste Voranalyse der Daten erfolgen.

Dabei wurden die folgenden 19 Gene aus dem Kollektiv ausgesucht, die in den parallelisierten Experimenten auffällige und reproduzierbare Effekte hervorgerufen haben:

| | | | |
|---------|---------|--------|----------|
| ADRBK1 | CFL1 | CRABP1 | FASTK |
| PPM1G | PPP2R1A | PPP2R4 | Syndecan |
| TAPBP | TM4SF1 | EB12 | FRA2 |
| GTF2F2 | IFI27 | MAPRE2 | PKM2 |
| SUV39H1 | PRKCZ | RRAS | |

Es erfolgte eine Literaturrecherche, um innovative oder unerwartete Ergebnisse aufzudecken. Es zeigte sich, dass einige der oben genannten Kandidaten bereits

Gegenstand der Forschung waren. Beispielsweise war bekannt, dass das Gen PKM2 bereits innerhalb des NGFN-Konsortiums untersucht wird. Aufgrund dessen wurde der Kreis der Kandidaten, die für nachfolgende Validierungsanalysen in Frage kommen, nochmals auf 12 Gene eingeschränkt, die in untenstehender Tabelle 34 aufgelistet sind. Hier wurden auch die Ergebnisse aus den Repressionsanalysen berücksichtigt, die von Tatjana Honstein durchgeführt wurden.

Tabelle 34: Liste der für die Validierung ausgesuchten Gene und deren Auswahlkriterien.

| Gen | Expressionsstatus | Auswahlkriterium |
|-----------------|-------------------|---|
| CFL1 | ÜE | ↑: Unterschiede in „FBS 10 % vs. FBS 0 %“, Literaturdaten |
| CRABP1 | ÜE | ↑: Signal in Ki67-Assay ↓: Strukturveränderung im Vimentin-Assay |
| FASTK | ÜE | ↑: Unterschiede in „FBS 10 % vs. FBS 0 %“, Unterschiede in „CFP vs. YFP“ |
| PPM1G | ÜE | ↑: Unterschiede in „FBS 10 % vs. FBS 0 %“, Signal im Caspase3-Assay |
| PPP2R1A | ÜE | ↑: Unterschiede in „FBS 10 % vs. FBS 0 %“, Unterschiede in „CFP vs. YFP“ Signale im Caspase3-, Cyclin B1- und E-Cadherin-Assay |
| PPP2R4 | ÜE | Literaturdaten; Interaktionspartner von PPP2R1A |
| Syndecan | ÜE | Literaturdaten |
| TM4SF1 | ÜE | ↓: Strukturveränderung im Vimentin-Assay |
| EB12 | UE | ↑: Signal im Caspase3-Assay |
| FRA2 | UE | ↑: Unterschiede in „FBS 10 % vs. FBS 0 %“, Unterschiede in „HEK-293 vs. transformiert“ Signale im Caspase3-Assay |
| GTF2F2 | UE | ↑: Unterschiede in „FBS 10 % vs. FBS 0 %“, Unterschiede in „HEK-293 vs. transformiert“ Signal im Caspase3-Assay |
| IFI27 | PanIN | ↑: Signal im E-Cadherin-Assay |

ÜE: Gen ist überexprimiert im Pankreaskarzinom; UE: Gen ist unterexprimiert im Pankreaskarzinom; PanIN: Gen ist spezifisch exprimiert im Pankreaskarzinom; ↑: Experimente nach der Überexpression der Kandidatengene; ↓: Experimente nach der Repression der Kandidatengene.

Für diese Konstrukte wurden verschiedene Validierungs-Assays im „forward“-Format durchgeführt, um die Ergebnisse aus dem „Reverse Transfection“-Format überprüfen zu können. Hierbei wurden die Zellen wie in der Analyse der PaCaNet-Gene in 24-Loch-Platten mit Deckgläsern bzw. in 96-Loch-Platten ausgesät (vgl. Kap. 4.1.4).

Nachdem auch hier die subzelluläre Lokalisation sowie die Funktion mithilfe der Fusionskonstrukte bzw. den Antikörpern bestimmt wurde, konnte die Auswertung nach dem bekannten Schema erfolgen.

In den folgenden Tabellen 35 und 36 sind die Daten aus der reversen Transfektion und die dazugewonnenen Erkenntnisse aus den Validierungsassays für die 12 vorab ausgewählten Gene gegenüber gestellt. Durch diese zusätzlichen Assays im „forward“-Format konnten sowohl bereits bestehende Ergebnisse gefestigt (z.B. PPM1G, PPP2R1A) als auch neue Daten hinzugewonnen werden (z.B. CFL1, FASTK). Allerdings konnten mittels der Validierungs-Assays auch potentiell falsch-positive Ergebnisse aus den Experimenten im „reverse“-Format aufgedeckt werden (z.B. FRA2 bzgl. Lokalisation; PPP2R1A).

Tabelle 35: Gegenüberstellung der "reverse"- und "forward"-Ergebnisse aus den Validierungsassays: Lokalisation und Apoptose. Gezeigt werden die Ergebnisse für die 12 zur Validierung ausgewählten Kandidatengenen in den verschiedenen Auswertungs-Kategorien „Lokalisation“, „Morphologie“ und „Apoptose“ jeweils aus den „Reverse Transfection“-Experimenten (R) sowie auch aus den Validierungsexperimenten im „forward“-Format (F).

| Gen | Lokalisation | | | | | | Morphologie | | | | Apoptose | | | | | | | |
|----------|-----------------|----|------------------|----|-------------|----|-------------|---|--------|----|-----------------|---|--------|----|----------------|---|--------|----|
| | HEK vs. Transf. | | FBS 10 % vs. 0 % | | CFP vs. YFP | | | | | | Casp3; FBS 10 % | | | | Casp3; FBS 0 % | | | |
| | | | | | | | HEK-293 | | PANC-1 | | HEK-293 | | PANC-1 | | HEK-293 | | PANC-1 | |
| | R | F | R | F | R | F | R | F | R | F | R | F | R | F | R | F | R | F |
| CFL1 | | | + | | | | | | | | | | | | | | | |
| CRABP1 | | | + | | | | | | | | | | | | | | | + |
| FASTK | | ++ | | | + | | | | | | | | | + | | | | |
| PPM1G | | ++ | ++ | ++ | | | | | | | + | + | | | | | | |
| PPP2R1A | + | + | ++ | | | | | | | | + | | | | | | | |
| PPP2R4 | | + | ++ | + | | | | | | | | | | | | | | + |
| Syndecan | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TM4SF1 | | | | | | | | | | | | | | + | | | | |
| EB12 | | | | | | | | | | ++ | + | | | | | | | |
| FRA2 | ++ | | ++ | | | | | | | | ++ | + | ++ | ++ | + | | | ++ |
| GTF2F2 | ++ | | + | | | | | | | | + | + | | + | | | | + |
| IFI27 | | | | | ++ | ++ | | | | | | + | | | | | | |

R = „reverse“-Format; F = „forward“-Format; ++ = $n \geq 3$; + = $1 \leq n \leq 3$.

Tabelle 36: Gegenüberstellung der „reverse“- und „forward“-Ergebnisse aus den Validierungsassays: Proliferation und Differenzierung / EMT. Gezeigt werden die Ergebnisse für die 12 Kandidatengene in den Auswertungs-Kategorien „Proliferation“ und „Differenzierung / EMT“. Auch hier erfolgt die direkte Gegenüberstellung der Daten aus „reverse“- und „forward“-Format.

| Gen | Proliferation | | | | | | | | Differenzierung / EMT | | | | | | | |
|----------|---------------|---|--------|----|-----------|---|--------|-----|-----------------------|-----|--------|-----|------------|---|--------|----|
| | Ki67 | | | | Cyclin B1 | | | | Vimentin | | | | E-Cadherin | | | |
| | HEK-293 | | PANC-1 | | HEK-293 | | PANC-1 | | HEK-293 | | PANC-1 | | HEK-293 | | PANC-1 | |
| | R | F | R | F | R | F | R | F | R | F | R | F | R | F | R | F |
| CFL1 | | | | ++ | | | | (+) | | (+) | | | | | | |
| CRABP1 | + | + | | | | | | | | | | | | | | |
| FASTK | | + | | ++ | | | | | | | | | | | | |
| PPM1G | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PPP2R1A | | | | | | | + | | | | | | | | ++ | ++ |
| PPP2R4 | | + | | + | | | | | | | | | | | | ++ |
| Syndecan | | | | | | | | | | + | | | | | | |
| TM4SF1 | | + | | + | | | | | | | | | | | | ++ |
| EB12 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| FRA2 | | | | | | | | | | | | (+) | | | | |
| GTF2F2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IFI27 | | | | | | | | | | | | | | | + | |

R = „reverse“-Format; F = „forward“-Format; ++ = $n \geq 3$; + = $1 \leq n \leq 3$; (+) = $n = 1-2$ oder undeutlich.

4.1.6 Die Evaluation der parallelisierten Daten führt zu 10 Kandidatengenen mit relevanten Effekten

Die Hochdurchsatzanalysen in dem von uns verwendeten parallelisierten Ansatz haben für die meisten der 79 Kandidatengene funktionelle Daten geliefert. Durch die Validierung interessanter Ergebnisse im „forward“-Format konnten bereits bestehende Daten gefestigt und weitere hinzugewonnen werden. Auch für die 12 zusätzlichen PaCaNet-Gene konnten sowohl die Lokalisationsdaten als auch solche zu ihrer zellulären Funktion ermittelt werden.

Eine abschließende, detaillierte Evaluation des gesamten Datensatzes führte letztendlich zu 10 Kandidatengenen, die für die im Anschluss geplante Einzel-Charakterisierung in Frage kamen und deren Ergebnisse aus den parallelisierten Versuchen in den nachfolgenden Tabelle 37 und 38 dargestellt sind.

Tabelle 37: Zusammenfassung der Überexpressions-Daten bezüglich der subzellulären Lokalisation und der Zellmorphologie für die 10 ausgewählten Kandidatengene. Gezeigt werden die Ergebnisse in den 3 Kategorien „HEK vs. transfizierte Zellen“, „FBS 10 % vs. 0 %“, sowie CFP vs. YFP“. In der Kategorie „Morphologie“ ergaben sich bezüglich dieser 10 Gene keine Auffälligkeiten.

| Gen | | Lokalisation | | | Morphologie | |
|----------------|--------------|---|------------------|-------------|-------------|--------|
| | | HEK vs. Transf. | FBS 10 % vs. 0 % | CFP vs. YFP | HEK-293 | PANC-1 |
| CFL1 | ÜE | | + | | | |
| FASTK | ÜE | ++ | | + | | |
| PPM1G | ÜE | ++ | ++ | | | |
| PPP2R1A | ÜE | + | ++ | | | |
| PPP2R4 | ÜE | + | ++ | | | |
| SUV39H1 | ÜE | ++ | + | | + | |
| FRA-2 | UE | ++ | ++ | | | |
| GTF2F2 | UE | ++ | + | | | |
| C8orf20 | PanIN | keine Auffälligkeiten / aus Repressionsanalysen ausgewählt | | | | |
| CST3 | PanIN | | | | | |

ÜE: Gen ist überexprimiert im Pankreaskarzinom; UE: Gen ist unterexprimiert im Pankreaskarzinom; PanIN: Gen ist spezifisch exprimiert im Pankreaskarzinom; ++ = $n \geq 3$; + = $1 \leq n \leq 3$.

Für 8 der 10 Gene zeigten sich Veränderungen bezüglich ihrer subzellulären Lokalisation (Tab. 37). Diese zeigten bis auf CFL1 im Vergleich zwischen transformierten und nicht-transformierten Zellen unterschiedliche Lokalisationen der Genprodukte. Diese Veränderungen konnten für fast alle Gene auch in der Kategorie „FBS 10 % vs. 0 %“ beobachtet werden, lediglich FASTK wies diese Lokalisationsänderung nicht auf. Allerdings konnten für dieses Gen Unterschiede in Abhängigkeit des transfizierten Konstrukts (CFP oder YFP) gefunden werden. CFL1 wies nur leichte Veränderungen der subzellulären Lokalisation auf. Hier zeigte sich eine veränderte Verteilung in Abhängigkeit des Serumgehalts. Bezüglich ihrer Morphologien konnte lediglich für SUV39H1 eine Auffälligkeit festgestellt werden. In Tabelle 38 sind die zugehörigen funktionellen Daten zu den 10 Kandidatengenen zusammengefasst.

Tabelle 38: Zusammenfassung der Überexpressions-Daten bezüglich Zellfunktionen der 10 ausgewählten Gene. Gezeigt werden die Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen zur Überprüfung der Zellfunktionen „Apoptose“, „Proliferation“ & „Differenzierung / EMT“ für HEK-293- und PANC-1-Zellen in An- und Abwesenheit von FBS.

| Gen | | Apoptose | | | | Proliferation | | | | Differenzierung / EMT | | | |
|---------|-------|---|----|-------------------|----|---------------|----|-----------|-----|-----------------------|-----|------------|----|
| | | Casp3; FBS 10 % | | Casp3; FBS 0 % | | Ki67 | | Cyclin B1 | | Vimentin | | E-Cadherin | |
| | | H | P | H | P | H | P | H | P | H | P | H | P |
| CFL1 | ÜE | | | | | | ++ | | (+) | (+) | | | |
| FASTK | ÜE | | + | | | + | | | ++ | | | | |
| PPM1G | ÜE | + | | | | | | | | | | | |
| PPP2R1A | ÜE | + | | | | | | | + | | | | ++ |
| PPP2R4 | ÜE | | | | + | + | + | | | | | | ++ |
| SUV39H1 | ÜE | ++ | ++ | | | | | | | | | | |
| FRA-2 | UE | + | ++ | + | ++ | | | | | | (+) | | |
| GTF2F2 | UE | + | + | | + | | | | | | | | |
| C8orf20 | PanIN | keine Auffälligkeiten / aus Repressionsanalysen ausgewählt | | | | | | | | | | | |
| CST3 | PanIN | | | | | | | | | | | | |

ÜE: Gen ist überexprimiert im Pankreaskarzinom; UE: Gen ist unterexprimiert im Pankreaskarzinom; PanIN: Gen ist spezifisch exprimiert im Pankreaskarzinom; H = HEK-293-Zellen; P = PANC-1-Zellen; ++ = $n \geq 3$; + = $1 \leq n \leq 3$; (+) = $n = 1-2$ oder undeutlich.

Bis auf die beiden PanIN-Gene, die auf Basis der Repressionsdaten ausgesucht wurden, konnten für alle Gene unterschiedliche Ergebnisse in den einzelnen Kategorien festgestellt werden. So zeigte sich beispielsweise für das Gen CFL1 ein Proliferations-Phänotyp mit reproduzierbaren Effekten im Ki67- und schwachen Effekten im Cyclin B1-Assay. Außerdem zeigten sich auch Signale im Differenzierungs-Assay mittels des Vimentin-Antikörpers. Im Gegensatz dazu ergab sich für das FRA-2-Gen ein apoptotischer Phänotyp. Hier führte die Überexpression des Kandidaten zu einem deutlichen Anstieg der Apoptoserate, wie im Caspase3-Assay festgestellt werden konnte. Die beiden Gene C8orf20 und CST3 aus der PanIN-Kategorie zeigten in den Überexpressionsversuchen keine auffälligen Phänotypen. Allerdings zeigten diese in den Repressionsanalysen (Daten von Tatjana Honstein) auffällige Merkmale und wurden deshalb für die weiteren Einzelanalysen ausgewählt. Nach der Färbung mit dem Vimentin-Antikörper zeigten beispielsweise C8orf20-transfizierte Zellen eine

auffällige Strukturveränderung und filamentöse Verzweigungen der Zellmembran. Auch für CST3-transfizierte Zellen zeigte sich in HEK-293-Zellen eine Strukturveränderung.

4.2 EINZEL-CHARAKTERISIERUNG VON CFL1

4.2.1 Auswahl eines geeigneten Kandidaten für die Einzel-Charakterisierung

Eines der Gene, welches im Zuge der parallelisierten Charakterisierung analysiert wurde, war Cofilin-1 (CFL1). Sowohl in der Literatur als auch in den dieser Arbeit vorangegangenen Analysen der Genexpression wird CFL1 im Pankreaskarzinom als überexprimiert beschrieben. In den von uns durchgeführten parallelisierten Analysen ergaben sich für CFL1 reproduzierbare Effekte in den Proliferations-Assays. Nach der Überexpression von CFL1 in PANC-1-Zellen zeigten hier sowohl der Ki67- als auch der Cyclin B1-Antikörper Signale, die mit den Transfektionssignalen der Zellen korrelierten. Auch ergab sich für den Caspase3-Antikörper in PANC-1-Zellen ein leichter Effekt. Diese Ergebnisse spiegeln im Falle der Überexpression dieses Gens einen Proliferations-Phänotyp wider. Im Vergleich zu diesen Daten wird Cofilin-1 in der Literatur überwiegend mit migratorischen Effekten in Zusammenhang gebracht, während Einflüsse auf das Zellwachstum nur sporadisch beschrieben sind und bezüglich Krebserkrankungen nahezu völlig fehlen (vgl. Einleitung, Kap. 1.4). Aufgrund dieser Ergebnislage stellte CFL1 in dieser Studie einen interessanten Kandidaten für eine weiterführende Detailanalyse dar.

4.2.2 Cofilin-1 zeigt eine gesteigerte Genexpression in pankreatischen Tumorgeweben und Zelllinien

Zu Beginn der Analyse wurden zunächst menschliches Pankreasgewebe sowie verschiedene Karzinomzelllinien herangezogen, um den Expressionsstatus von Cofilin-1 auf Protein- sowie mRNA-Ebene zu ermitteln.

Zunächst erfolgten hierzu immunhistologische Färbungen, die nach einem standardisierten Verfahren von Dr. Bence Sipos im pathologischen Institut der Universität Tübingen anhand von „Tissue Microarrays“ (TMAs) durchgeführt wurden. Diese Arrays erlauben die gleichzeitige Färbung von gesundem und karzinogenem Gewebe in einem Arbeitsschritt. Mithilfe eines spezifischen Antikörpers (Verdünnung

1:1.200) wurde die CFL1-Expression in gesundem Gewebe mit der im Karzinomgewebe verglichen (s. nachstehende Abb. 11). In den beiden Beispielbildern des gesunden Donor-Gewebes (A & B) indizieren schwache Antikörper-Signale (braun) einen geringen Gehalt an endogenem CFL1, während die TMA-Bereiche mit den Karzinompräparaten im Vergleich eine deutlich gesteigerte CFL1-Expression (C & D) zeigen. Die Bereiche um die pankreatischen Gänge sind hier großflächig gefärbt und auch im Tumorstroma zeigen sich zusätzlich einzelne Zellen mit einer starken CFL1-Expression.

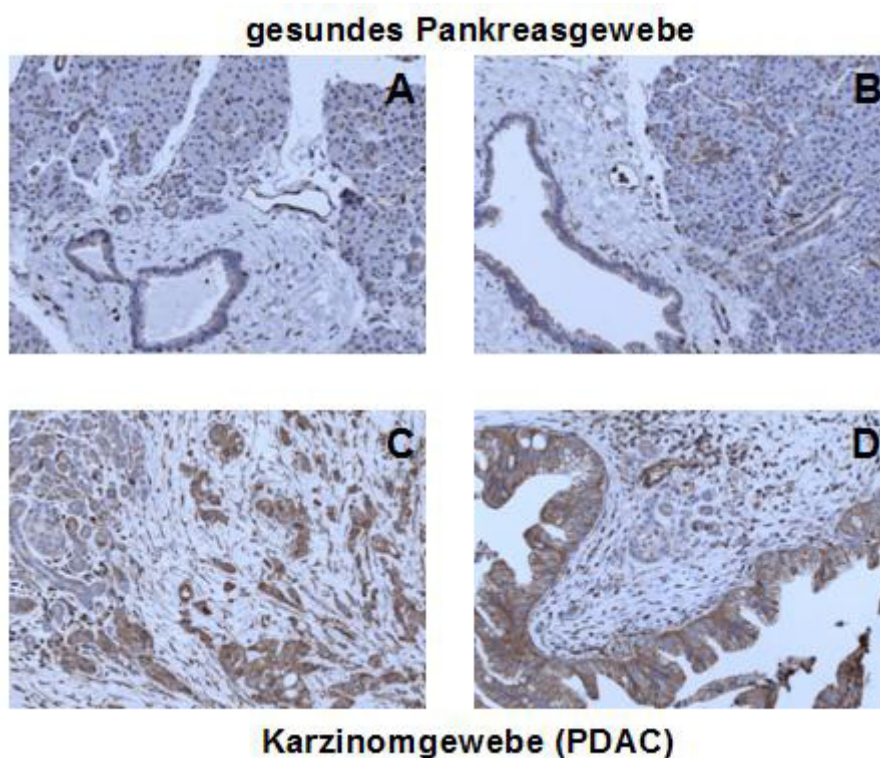


Abbildung 11: Immunhistologische Färbung von Cofilin-1 in humanem Pankreasgewebe. „Tissue Microarrays“ (TMAs) des humanen Pankreaskarzinoms wurden an der Universität Tübingen mit einem CFL1-Antikörper (1:1.200) behandelt. Das gesunde Donor-Gewebe weist einen niedrigen CFL1-Level auf (A-B), während Gewebeproben des duktales Pankreaskarzinoms (PDAC) eine hohe Expressionsrate zeigen (C-D). CFL1: braun; Zellkerne: blau.

Nach der erfolgreichen Färbung der TMAs folgte die softwarebasierte Auswertung. Insgesamt beinhalteten die TMAs 41 gesunde Donor- sowie 73 Tumorgewebe. Ausgewertet wurden insgesamt 199 normale und neoplastische Gänge. Nach Kalibrierung der Software erfolgten die automatisierte Auswertung der gefärbten Bereiche und die anschließende Erstellung eines Histocores (HS), der sich aus den Färbungsintensitäten des TMAs berechnete. Die Analyse ergab, dass CFL1 in

karzinogenem Gewebe sehr viel höher exprimiert ist (HS ~150) als in gesundem Donor-Gewebe (HS ~110; vgl. Abb. 12). Diese CFL1-Überexpression ist nach der statistischen Analyse als hoch-signifikant zu bewerten (Mann-Whitney-U: $p < 0,0001$).

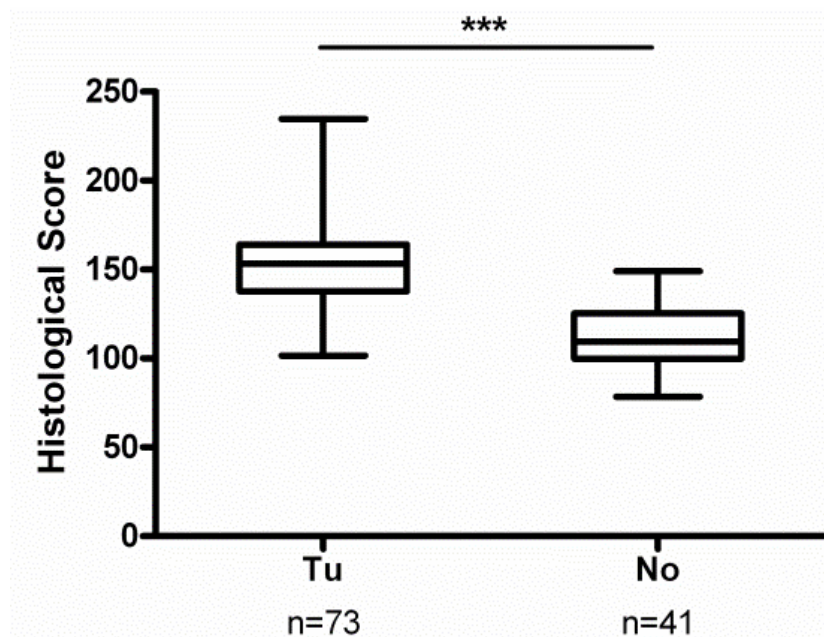


Abbildung 12: Quantitative Auswertung der immunhistologischen Färbungen. Die TMAs enthielten 41 gesunde Donor- und 73 Tumorgewebe, die insgesamt 199 pankreatische Gänge beinhalteten. Es wurde ein histologischer Score erstellt, der sich aus den Färbungsintensitäten der histologischen Schnitte berechnete. Der statistische Vergleich zwischen der Expression in gesundem und kanzerogenem Gewebe ergab eine hoch-signifikante Überexpression von CFL1 in neoplastischem Gewebe (Mann Whitney U: $p < 0,0001$). No = gesundes Donor-Gewebe; Tu = kanzerogenes Gewebe; n = Anzahl der Proben auf dem TMA; *** = $p < 0,0001$.

Für die Analyse der mRNA-Expression wurde diese aus verschiedenen pankreatischen Geweben extrahiert und mittels quantitativer RealTime-PCR auf ihren CFL1-Gehalt untersucht. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt (s. Folgeseite). Es zeigte sich, dass die endogene CFL1-Expression in den 12 PDAC-Proben im Vergleich zu den chronischen Pankreatitiden (CP) und dem gesunden Spendergewebe (Donor) signifikant erhöht ist ($p < 0,0001$), während sich zwischen den beiden letztgenannten Kategorien kein statistischer Unterschied ergibt ($p = 0,30$).

Die Daten bestätigen somit die bereits in vorangegangenen Hochdurchsatz-Analysen beobachtete Überexpression von Cofilin-1 im humanen Pankreaskarzinom im Vergleich zu gesundem Gewebe.

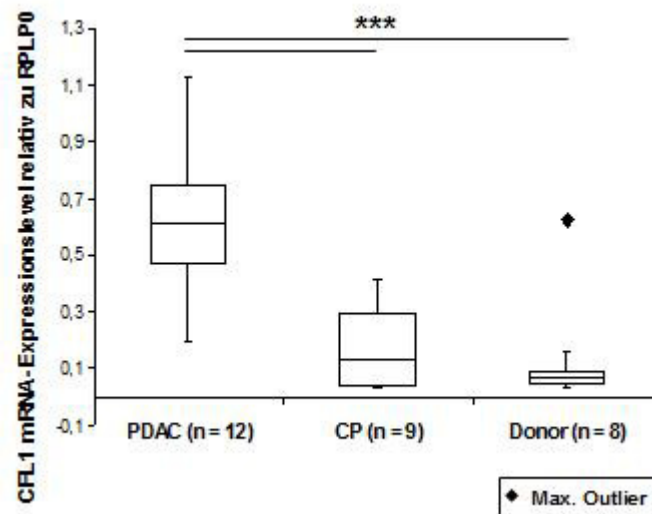


Abbildung 13: Expression von CFL1 in pankreatischen Geweben. Mittels quantitativer RealTime-PCR wurden die mRNA-Expressionslevel von CFL1 in Geweben des Pankreaskarzinoms (PDAC), chronischer Pankreatitiden (CP) und gesunder Spenderorgane analysiert. Es erfolgte eine Normalisierung der Rohwerte auf das Haushaltsgen RPLP0. Die statistische Analyse ergab eine hoch-signifikante Überexpression von CFL1 in PDAC-Geweben im Vergleich zur chronischen Pankreatitis und gesundem Donorgewebe ($p < 0,0001$), während sich letztere nicht signifikant voneinander unterscheiden ($p = 0,30$). PDAC = pankreatisches duktales Adenokarzinom; CP = chronische Pankreatitis; n = Anzahl der Proben; *** = $p < 0,0001$.

Um für die im Anschluss geplanten Überexpressions- und Repressionsanalysen die geeigneten Zelllinien auswählen zu können, wurden mithilfe der qRT-PCR auch die CFL1-Expressionslevel der im Labor gängigen Pankreaskarzinom-Zelllinien ermittelt. Die benötigte RNA wurde aus Zellpellets isoliert und für die qRT-PCR vorbereitet. Als Vergleichszelllinie dienten die nicht-transformierten HEK-293-Zellen. Die ermittelten Werte wurden auch hier auf das Haushaltsgen RPLP0 normalisiert.

Wie in Abbildung 14 erkennbar ist, zeigen IMIM-PC1-Zellen in diesem Proben-Satz die höchste CFL1-Expression, während PaTu 8988T-Zellen eine vergleichbar geringe Expression aufweisen (s. Folgeseite). Die im Labor häufig verwendeten Zelllinien PANC-1, S2-007, S2-028 und IMIM-PC2 exprimieren ebenfalls hohe Mengen an nativem Cofilin-1, wobei letztere nur die Hälfte des Niveaus ihrer Schwesterzelllinie erreichen. Im Vergleich zu diesen Ergebnissen sind die nicht-karzinogenen HEK-293-Zellen durch ein niedriges Level gekennzeichnet, vergleichbar mit dem der PaTu 8988T-Zellen.

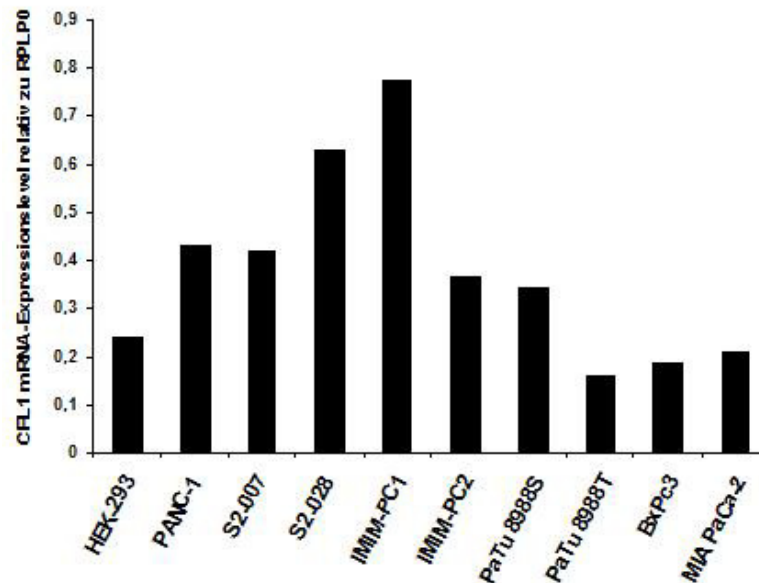


Abbildung 14: Expressionslevel von Cofilin-1 in verschiedenen Zelllinien. Mithilfe der quantitativen RealTime-PCR wurden die mRNA-Level von CFL1 in verschiedenen transformierten Zelllinien des Pankreaskarzinoms sowie der nicht-transformierten Zelllinie HEK-293 bestimmt. Es erfolgte eine Normalisierung auf die Expression des Haushalts-Gens RPLP0. CFL1 wird in allen Zelllinien exprimiert, wobei IMIM-PC1-Zellen die höchste Expression aufweisen.

Basierend auf dieser Datenlage konnten für die anschließenden *in vitro*-Analysen die geeigneten Zelllinien ausgesucht werden. Als Modell für eine mittlere Expression wurden PANC-1-Zellen ausgewählt, um sowohl Überexpressions- als auch Repressionsstudien durchführen zu können. Als zweite Zelllinie für die Überexpressionsstudien dienten die IMIM-PC2-Zellen, da sie eine vergleichbare Expression wie die PANC-1-Zellen aufweisen. Als weitere Zelllinien für die Repressions-Assays wurden IMIM-PC1-Zellen mit der hohen CFL1-Expression, sowie die Schwesterzelllinien S2-007 und -028 ausgewählt. Als Kontrollzelllinie dienten hier die HEK-293-Zellen mit ihrer vergleichbar niedrigen Expressionsrate.

4.2.3 Die CFL1-Überexpression mittels rekombinanter Fusionsproteine bestätigt die Ergebnisse der Hochdurchsatz-Analysen

Die vorangegangenen Hochdurchsatz-Analysen indizierten für Cofilin-1 einen proliferativen Phänotyp, der sich durch immunzytologische Färbungen mit einem Ki67- und einem Cyclin B1-Antikörper nachweisen ließ. Um diese Ergebnisse zu validieren, wurden mit den in den parallelisierten Versuchen verwendeten Fusionskonstrukten

CFP-CFL1 und CFL1-YFP zusätzliche Einzelversuche in den Zelllinien PANC-1 und IMIM-PC2 durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Effizienz einer transienten Transfektion der beiden Fusionskonstrukte qualitativ und quantitativ beurteilt.

Abbildung 15 zeigt fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahmen für die Zelllinien PANC-1 und IMIM-PC2, die mit den beiden Konstrukten transfiziert wurden. In beiden Zelllinien zeigt sich eine annehmbare Anzahl von fluoreszierenden Zellen sowohl mit dem CFP- als auch dem YFP-Konstrukt. Es konnte allerdings festgestellt werden, dass sich bezüglich des YFP-Konstrukts in den PANC-1-Zellen ca. doppelt so hohe Effizienzen ergaben wie in den IMIM-PC2-Zellen.

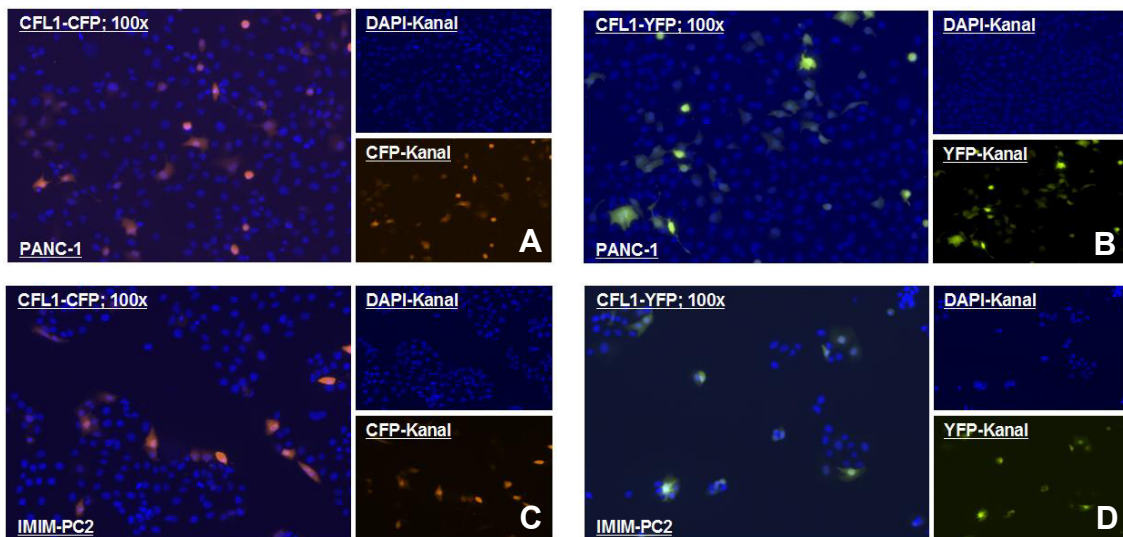


Abbildung 15: Exemplarische Darstellung der Transfektionseffizienzen der CFL1-Überexpressionskonstrukte. Gezeigt werden die beiden Fluoreszenz-Konstrukte transfiziert in PANC-1- (A & B) sowie IMIM-PC2-Zellen (C & D). Die großen Bilder stellen Mehrkanalaufnahmen in 100-facher Vergrößerung dar, die kleinen Bilder zeigen jeweils den zugehörigen DAPI- sowie CFP- bzw. YFP-Kanal. Es zeigt sich eine annehmbare Transfektionseffizienz für beide Konstrukte, wobei die Effizienzen in PANC-1 höher sind als in IMIM-PC2-Zellen. DAPI: blau; CFP-Kanal: braun; YFP-Kanal: grün.

An dieser Stelle konnten noch einmal zusätzliche Aufnahmen mit der 630-fachen Vergrößerung durchgeführt werden, um die in den parallelisierten Versuchen beobachtete ubiquitäre Lokalisation der Genprodukte abzusichern. Die Dokumentation dieser Ergebnisse ist in Abbildung 16 für PANC-1 (YFP-Konstrukt, A) und IMIM-PC2 (CFP-Konstrukt, B) dargestellt (s. Folgeseite). Des Weiteren sind in diesen Aufnahmen viele filopodien-förmige Zell-Zell-Verbindungen erkennbar, die ebenfalls eine deutliche CFL1-Expression aufweisen.

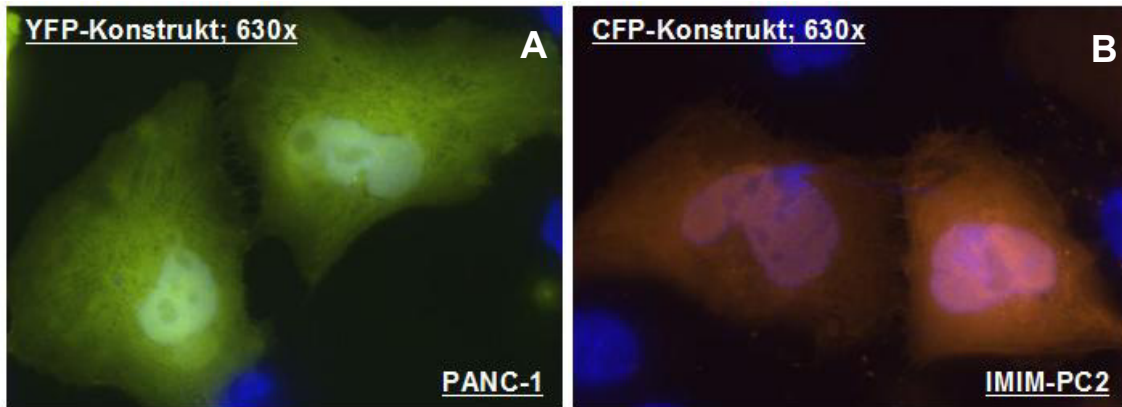


Abbildung 16: Subzelluläre Lokalisation von Cofilin-1 in verschiedenen Karzinom-Zelllinien. PANC-1-, IMIM-PC1- und S2-007-Zellen wurden mit den Überexpressionskonstrukten CFL1-CFP und CFL1-YFP transfiziert, wodurch in den Zellen die fluoreszierenden Fusionsproteine gebildet wurden. Nach einer Co-Färbung der Nuclei mit DAPI-Reagenz konnte die subzelluläre Lokalisation mithilfe des Zeiss Cell Observer® Fluoreszenz Mikroskops in 200- bzw. 630-facher Vergrößerung dokumentiert werden. **A:** PANC-1-Zellen transfiziert mit CFL1-YFP; YFP-Kanal = grün; DAPI-Kanal = blau. **B:** IMIM-PC2-Zellen transfiziert mit CFL1-CFP; CFP-Kanal = braun; DAPI-Kanal = blau.

Um die Transfektionseffizienz quantifizieren zu können, wurde hier ebenfalls die mRNA-Expression ermittelt und auf das Haushaltsgen RPLP0 normalisiert. Als Kontrollproben dienten zum einen unbehandelte Zellen, zum anderen mit GFP transfizierte Zellen. In PANC-1-Zellen ergab sich mit beiden Konstrukten eine Steigerung der CFL1-Expression um das 4-fache (s. Abb. 17).

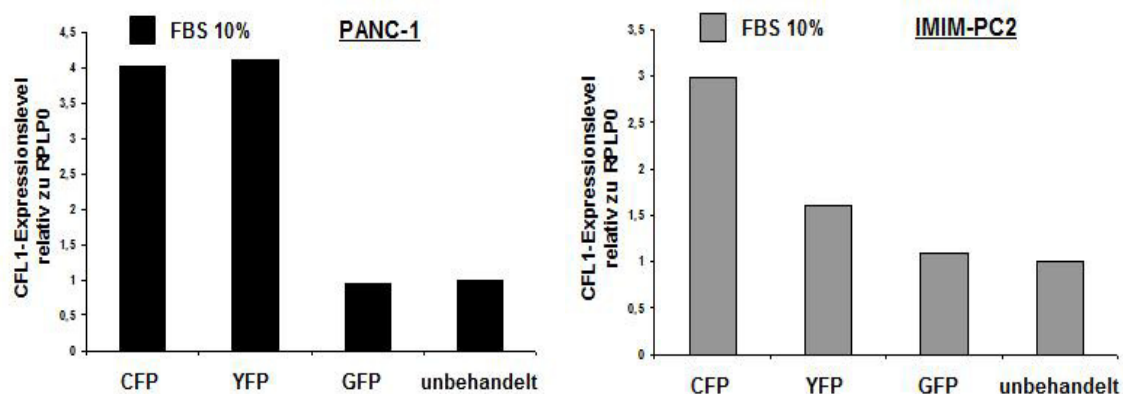


Abbildung 17: Effizienzen der transienten CFL1-Überexpression auf mRNA-Ebene. 48 h nach Transfektion der CFP-CFL1 und CFL1-YFP-Konstrukte in PANC-1- und IMIM-PC2-Zellen wurde das CFL1-Expressionslevel mittels qRT-PCR ermittelt und mit unbehandelten Zellen sowie GFP-transfizierten Kontrollzellen verglichen (n = 1). Es zeigte sich, dass die rekombinante CFL1-Expression in PANC-1-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen 4-fach erhöht war. In IMIM-PC2-Zellen konnte mit dem CFP-Konstrukt eine 3-fach gesteigerte CFL1-Expression erzielt werden. Mit dem YFP-Konstrukt ergab sich eine auf 1,5 erhöhte CFL1-Expression.

In IMIM-PC2-Zellen zeigte sich für das CFP-Konstrukt eine 3-mal so hohe CFL1-Expression als in den mit GFP behandelten Zellen. Das YFP-Konstrukt konnte in diesen Zellen nur eine 1,5-fache Zunahme des CFL1-Levels erzeugen. Dieses Resultat in den IMIM-PC2-Zellen war in den fluoreszenzmikroskopischen Analysen nur bedingt feststellbar. Hier zeigte sich für beide Konstrukte eine ähnliche Transfektionseffizienz (vgl. Abb. 15 C & D, s. o.). Die Quantifizierung wurde nur einmal durchgeführt, da die Transfektionseffizienz für die Folgeversuche mittels der Fluoreszenz überwacht werden konnte.

Nachdem somit sichergestellt war, dass die Transfektion der beiden Konstrukte in den beiden Zelllinien zu annehmbaren Effizienzen führt, wurden diese Zellen für die folgenden funktionellen Experimente verwendet.

Als erstes wurde der Einfluss der CFL1-Überexpression auf die Zellproliferation analysiert. Dazu wurden 48 Stunden nach transienter Transfektion mit CFP-CFL1, CFL1-YFP sowie einer GFP-Kontrolle BrdU-Assays mit dem Kit der Firma Roche durchgeführt.

Es wurden sowohl serumhaltige (FBS 10 %) als auch serumfreie (FBS 0 %) Zellkulturbedingungen getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt (s. Folgeseite). Eine Steigerung der CFL1-Expression führte zu einer leichten Zunahme der DNA-Synthese, wobei dieser Effekt in den PANC-1-Zellen deutlicher auftrat als in den IMIM-PC2-Zellen. In PANC-1-Zellen ergab sich unter serumhaltigen Bedingungen im Vergleich zur GFP-Kontrolle sowohl nach Transfektion des CFP- als auch des YFP-Konstrukts eine gesteigerte Proliferationsrate. Für die YFP-Variante blieb dieser Effekt auch bei serumfreien Bedingungen erhalten.

Im Vergleich dazu ergab sich in den IMIM-PC2-Zellen unter serumfreien Konditionen der stärkere Effekt, wobei dieser für die CFP-Variante deutlicher ausfiel als für die YFP-Variante. Allerdings war hier die Standardabweichung sehr hoch, wodurch der Effekt nur für das YFP-Konstrukt das Signifikanzniveau erreichte. Unter serumhaltigen Bedingungen zeigte sich in dieser Zelllinie keine Zunahme der DNA-Syntheserate im Vergleich zu den GFP-kontrolltransfizierten Zellen.

Letztendlich konnten bezüglich der Zell-Proliferation für beide Zelllinien die Trends der parallelisierten Charakterisierung bestätigt werden. Die gezeigten Daten resultieren aus den Mittelwerten von mindestens 3 unabhängig reproduzierten Experimenten.

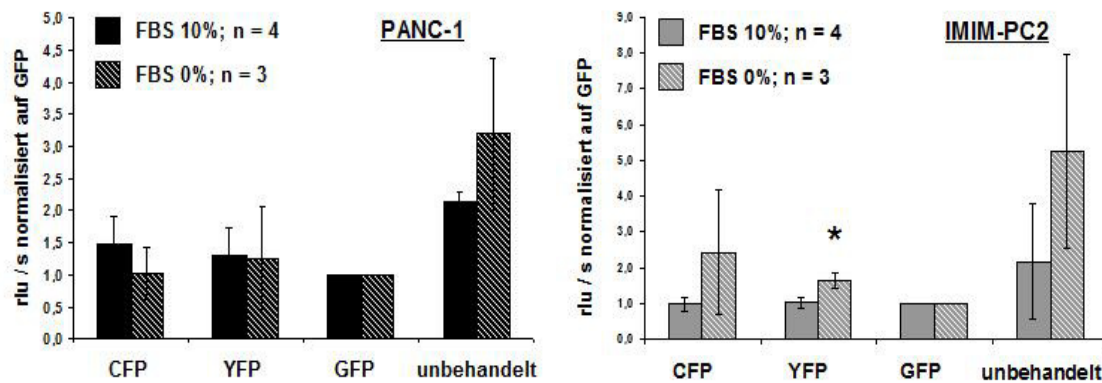


Abbildung 18: Regulation des Zellwachstums nach transienter Überexpression von CFL1. Es wurden in PANC-1- sowie IMIM-PC2-Zellen in An- bzw. Abwesenheit von FBS (10 bzw. 0 %) BrdU-Assays durchgeführt, um die Auswirkungen der Überexpression auf das Zellwachstum zu bestimmen. Nach der Behandlung mit CFL1-CFP und CFL1-YFP konnte im Vergleich zur GFP-Kontrolle allerdings nur in mit dem YFP-Konstrukt transfizierten IMIM-PC2-Zellen eine signifikante Zunahme in der Proliferation ermittelt werden. Die Behandlung mit dem CFP-Konstrukt und die Transfektion mit CFL1-YFP in PANC-1-Zellen zeigten ähnliche Tendenzen, allerdings wurde das Signifikanz-Niveau nicht erreicht. rlu / s = relative lights unit / second; * = $p < 0,05$; n = Anzahl der Versuche.

Neben den BrdU-Assays wurden zusätzlich MTT-Assays zu 2 verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt (48 bzw. 72 h nach Transfektion), um den Einfluss der CFL1-Überexpression auf die Zellviabilität zu analysieren. Ähnlich wie in den BrdU-Versuchen zeigte sich auch hier der Trend eines wachstumsfördernden Effekts von CFL1 (vgl. Abb. 19, Folgeseite). So führte die Transfektion des CFP-Konstrukts in PANC-1-Zellen sowohl nach 48 als auch nach 72 h zu einer leichten Zunahme der Zellviabilität im Vergleich zu den GFP-transfizierten Zellen. Ein ähnlicher Trend zeigte sich für die YFP-transfizierten Zellen, allerdings wurde hier das Signifikanzniveau nicht erreicht, was zum Teil auch in den hohen Standardabweichungen begründet war. Ein ähnliches Bild ergab sich für die serumfreien Bedingungen. Auch hier wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht, allerdings war auch hier im Vergleich zu den GFP-Kontrollzellen eine leichte Zunahme der Zellviabilität erkennbar.

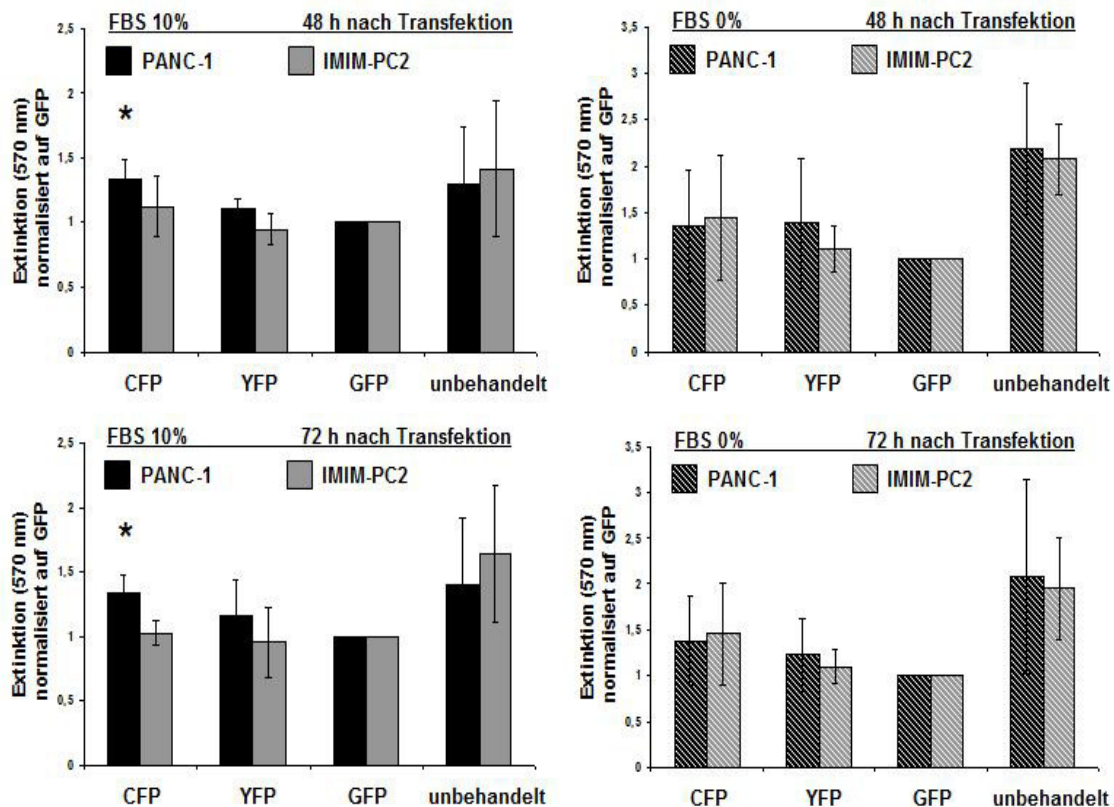


Abbildung 19: Regulation der Zellviabilität nach Überexpression von CFL1. Nach Transfektion mit den CFL1-Überexpressionskonstrukten wurden zusätzlich MTT-Assays durchgeführt. In CFL1-CFP-transfizierten PANC-1-Zellen konnte in Anwesenheit von FBS (10 %) sowohl nach 48 als auch nach 72 h eine signifikante Zunahme der Zellviabilität festgestellt werden. In Abwesenheit von FBS sowie bei Verwendung des YFP-Konstrukts zeigten sich ähnliche Trends, allerdings wurde das Signifikanz-Niveau nicht erreicht. In IMIM-PC2-Zellen konnte ein Einfluss der CFL1-Überexpression auf die Zellviabilität nicht festgestellt werden. Die Daten wurden aus mindestens 3 unabhängig reproduzierten Versuchen ermittelt. * = $p < 0,05$.

In den IMIM-PC2-Zellen ergab sich ein ähnliches Bild. Hier wurde das Signifikanzniveau für keine der Bedingungen erreicht. Zwar führte die Transfektion der beiden Konstrukte zu einer leichten Zunahme der Zellviabilität, allerdings waren die Effekte im Vergleich zu den PANC-1-Zellen eher gering.

Nachdem durch diese Experimente die Ergebnisse der parallelisierten Charakterisierung bezüglich eines Proliferations-Phänotyps tendenziell bestätigt werden konnten, wurden anschließend Assays zur Überprüfung des Einflusses einer CFL1-Überexpression auf die Karzinogenese und die Zellmigration durchgeführt.

Experimente bezüglich des substratunabhängigen Wachstums mit überexprimierten PANC-1-Zellen ergaben keinen Einfluss der transienten CFL1-Überexpression, wie sich in Abbildung 20 zeigt (s. Folgeseite). Während die CFP-Transfektion zu keiner Veränderung führte, ergab sich für das YFP-Konstrukt lediglich eine leichte Steigerung

der Kolonienanzahl. Allerdings ergab sich nach Bildung der Mittelwerte eine sehr hohe Standardabweichung. Für IMIM-PC2-Zellen konnte dieses Ergebnis nicht ausgewertet werden, da sich auch in wiederholten Experimenten für diese Zelllinien kein Kolonienwachstum ergab.

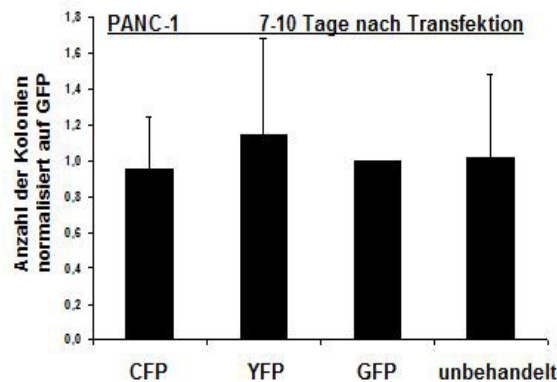


Abbildung 20: Die CFL1-Überexpression hat keinen Einfluss auf das substratunabhängige Wachstum. PANC-1-Zellen wurden mit den Überexpressionskonstrukten transfiziert und wurden analog zu den siRNA-Experimenten für mindestens 7 Tage im Soft Agar kultiviert. Die Auszählung der Kolonien ergab im Vergleich zu den GFP-Kontrollzellen keine gesteigerte Fähigkeit zum substratunabhängigen Wachstum. Auch die Größe der Kolonien wurde nicht beeinflusst.

4.2.4 Die Repression von CFL1 hemmt die Zellproliferation, ohne apoptotische Kaskaden auszulösen

Aufgrund des auf mRNA- und Proteinebene nachweisbar hohen CFL1-Levels im humanen Pankreaskarzinom und seinen Zelllinien, wurden neben den Überexpressionsanalysen auch RNAi-Experimente durchgeführt, um den Einfluss eines reprimierten CFL1-Status auf die Zellcharakteristik zu überprüfen. Dafür wurden 3 verschiedene siRNAs mit unterschiedlichen Basensequenzen in die 5 verschiedenen Zelllinien PANC-1, IMIM-PC1, S2-007, S2-028 und HEK-293 transfiziert und anschließend verschiedene funktionelle Analysen durchgeführt.

Zunächst wurde die Transfektionseffizienz der 3 siRNAs im Vergleich zu unbehandelten und mock-transfizierten Kontrollen sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene untersucht.

Die Analyse der mRNA-Expression zeigt, dass die CFL1-Expression in allen 5 Zelllinien in An- und Abwesenheit von FBS hoch-signifikant reprimiert werden konnte (vgl. Abb. 21, s. Folgeseite; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). Es ergaben sich Repressionsraten von 80-90 %. Lediglich die IMIM-PC1-Zellen blieben auch hinter diesem Niveau mit ca. 60 – 70 % etwas zurück.

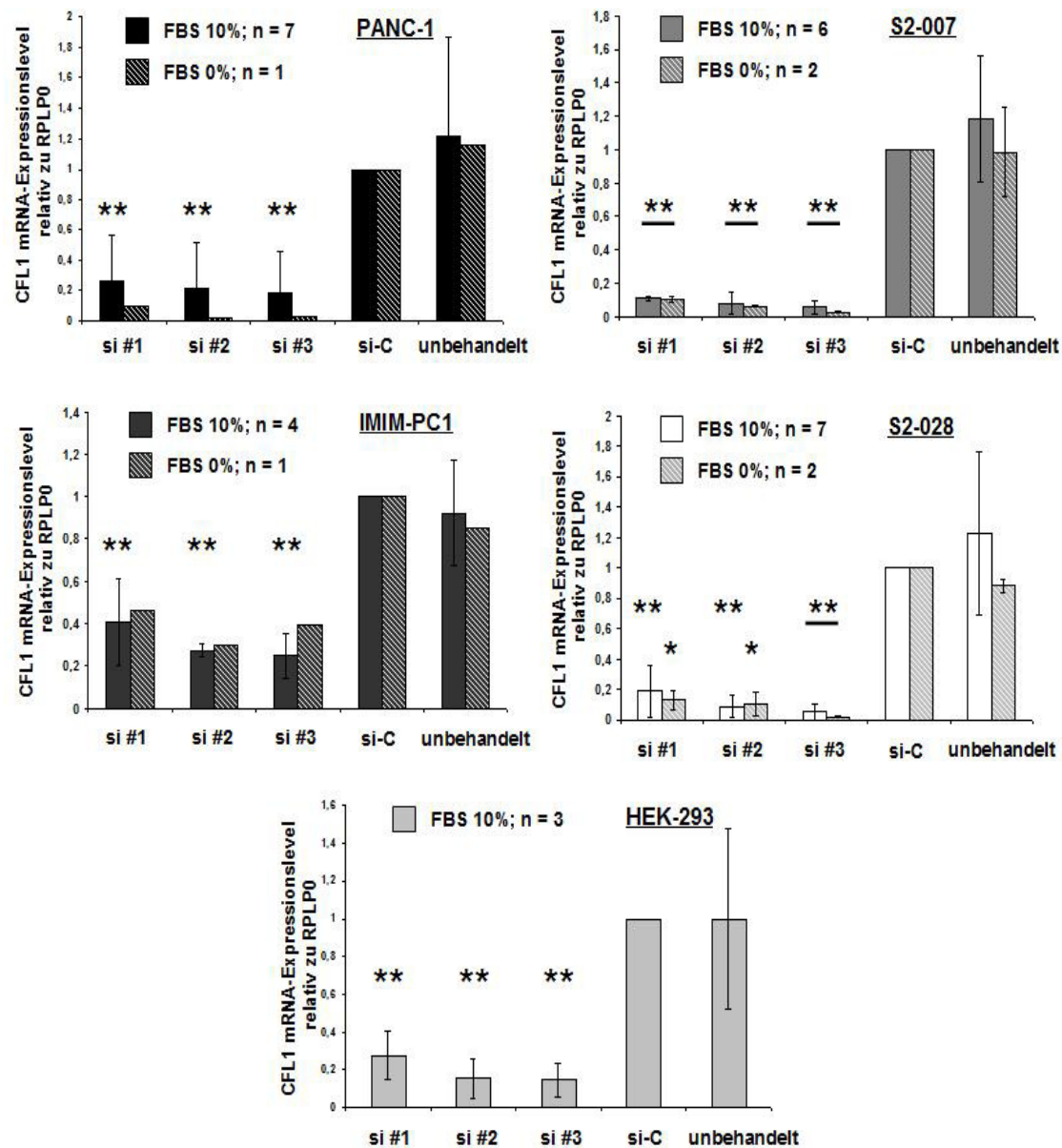


Abbildung 21: Effizienzen der transienten CFL1-Repression auf mRNA-Ebene. 5 verschiedene Zelllinien wurden in An- bzw. Abwesenheit von FBS (10 bzw. 0 %) mit verschiedenen siRNAs behandelt und ihre RNA nach 48-stündiger Inkubation isoliert. Für die qRT-PCR wurde 1 µg der RNA in cDNA umgeschrieben. Die ermittelte CFL1-Expression wurde auf die Expression von RPLP0 normalisiert. Die Versuche in Abwesenheit von FBS wurden mindestens 3-mal unabhängig reproduziert. Die Datenauswertung zeigt im Vergleich zur „Non silencing“-Kontrolle hoch signifikante Repressionseffizienzen von ~80 % für die 3 verschiedenen siRNAs in allen verwendeten Zelllinien. si #1,2,3 = siRNA 1-3; si-C = „Non silencing“-Kontrolle; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; n = Anzahl der Versuche.

Die immunologische Behandlung der Proteinlysate mit einem spezifischen CFL1-Antikörper verdeutlichte ebenfalls für alle 3 siRNAs im Vergleich zu den Kontrollproben („Non-silencing“-Kontrolle & unbehandelte Zellen) ein deutlich geringeres CFL1-Niveau (s. Abb. 22). Lediglich für die IMIM-PC1-Zellen blieb die Effizienz im Vergleich zu den anderen Zelllinien geringfügig zurück. Die hier exemplarisch dargestellten Ergebnisse konnten in 2 weiteren unabhängigen Versuchsansätzen reproduziert werden.

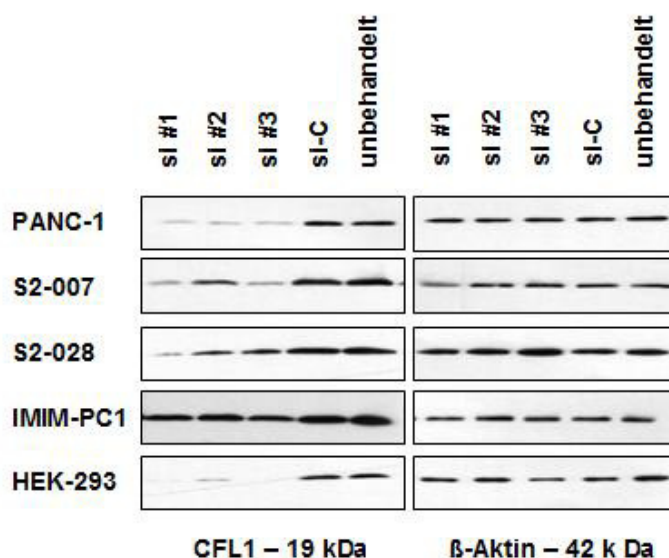


Abbildung 22: Effizienzen der transienten CFL1-Repression auf Protein-Ebene. Die Gesamtprotein-Extrakte wurden 72 h nach der Transfektion mit 3 verschiedenen siRNAs geerntet. Anschließend erfolgte der Nachweis mithilfe eines anti-CFL1-Antikörpers (Verdünnung 1:1.000). Die Western Blot-Analysen zeigen auf Proteinebene eine gute Repressions-Effizienz für alle 3 siRNAs. si #1,2,3 = siRNA 1-3; si-C = „Non-silencing“-Kontrolle.

Nach der transienten CFL1-Repression wurden in den 5 verwendeten Zelllinien zunächst BrdU-Assays durchgeführt (Cell Proliferation ELISA, BrdU chemoluminescence Kit, Roche). In Abbildung 23 sind die Resultate sowohl in An- als auch in Abwesenheit von FBS dargestellt (s. Folgeseite). Es zeigte sich, dass die Repression von CFL1 in den 4 Karzinomzelllinien PANC-1, S2-007, S2-028 und IMIM-PC1 generell eine Abnahme der Zellproliferation induziert. Gleichzeitig war erkennbar, dass die Ergebnisse in Abhängigkeit der Zellart und der unterschiedlichen siRNAs variieren.

In PANC-1-Zellen zeigte sich für die siRNAs #1 und #3 sowohl in An- als auch in Abwesenheit von FBS eine signifikante Abnahme des Zellwachstums um ca. 60 %. Auch siRNA #2 zeigt diesen Effekt, allerdings war er hier mit ca. 40 % etwas schwächer ausgeprägt und verlor sich unter serumfreien Bedingungen vollständig.

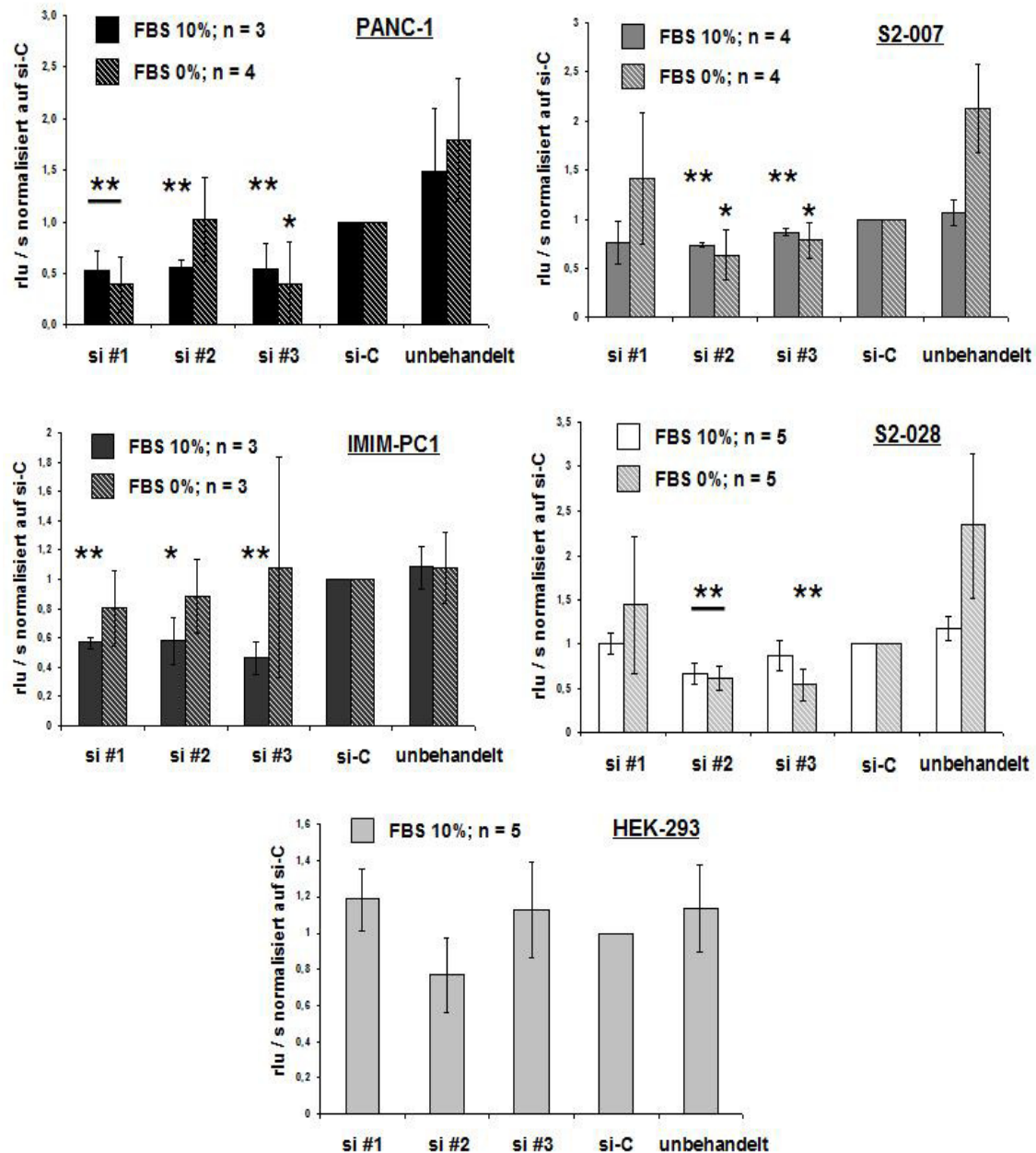


Abbildung 23: Regulation des Zellwachstums nach transienter Repression von CFL1. In An- bzw. Abwesenheit von FBS (10 bzw. 0 %) wurden 48 h nach der Transfektion BrdU-Assays durchgeführt, um eine mögliche Regulation der Proliferation aufzudecken. Für die Karzinom-Zelllinien PANC-1, IMIM-PC1, S2-007 und S2-028 konnte im Vergleich zur „Non-silencing“-Kontrolle für mindestens 2 der verschiedenen siRNAs eine signifikante Reduktion der Wachstumsaktivität festgestellt werden. Die nicht-transformierten Zellen HEK-293 zeigten diesen Effekt nicht. Alle Ergebnisse wurden in mindestens 3 unabhängigen Versuchen reproduziert. si #1,2,3 = siRNA 1-3; si-C = „Non-silencing“-Kontrolle; rlu / s = relative lights unit / second; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; n = Anzahl der Versuche.

In IMIM-PC1-Zellen ergab sich mit diesem Assay ein ähnliches Bild. Zwar wurde auch hier das Signifikanz-Niveau im Vergleich zu den Kontrollproben für alle 3 siRNAs

erreicht, allerdings beschränkte sich dieser Effekt auf die serumhaltigen Bedingungen. In Abwesenheit von FBS verschwand der Effekt völlig. Im Gegensatz zu PANC-1- und IMIM-PC1-Zellen induzierte die siRNA #2 in den Schwesterzelllinien S2-007 und S2-028 sowohl mit als auch ohne Serum mit 35-40 % den stärksten Proliferations-Rückgang. Gleichzeitig ergab sich für die siRNA #3 nur ein abgeschwächter Effekt, während siRNA #1 in beiden Zelllinien gänzlich ohne Einfluss blieb.

Zuletzt wurde der Assay mit den nicht-karzinogenen HEK-293-Zellen durchgeführt. Da diese Zelllinie in Abwesenheit von FBS generell nur sehr schlecht proliferiert, wurde hier auf die serumfreien Bedingungen verzichtet. Es zeigte sich aber, dass die Repression von CFL1 auch in einer serumhaltigen Umgebung keinen eindeutigen Einfluss auf das Zellwachstum hatte.

Letztendlich vermitteln die Ergebnisse, dass eine reprimierte CFL1-Expression in den verschiedenen Zelllinien des Pankreaskarzinoms in einem signifikanten Rückgang der Zellproliferation resultiert, dessen Intensität sowohl von den Serum-Bedingungen als auch von der spezifischen siRNA beeinflusst wird.

Um zu analysieren, ob die Transfektion der siRNAs nicht nur die Zellvermehrung, sondern auch die Anzahl der lebenden Zellen beeinflusst, wurden als weiterer Proliferationsversuch sowohl 48 als auch 72 Stunden nach Transfektion MTT-Assays durchgeführt.

In Abbildung 24 sind die Resultate für die verschiedenen Zelllinien zu den beiden Zeitpunkten und Serum-Konditionen dargestellt (s. Folgeseite). In den einzelnen Experimenten zeigten sich bezüglich der Zellviabilität nur moderate Effekte, die über den Zeitverlauf an Intensität zunahmen. Allerdings erreichten im Vergleich zu den Kontrollproben nur einzelne Versuchsproben das Signifikanz-Niveau von $p < 0,05$. Die starken Effekte der BrdU-Experimente können letztendlich nicht alleine auf eine sinkende Zellviabilität zurückgeführt werden.

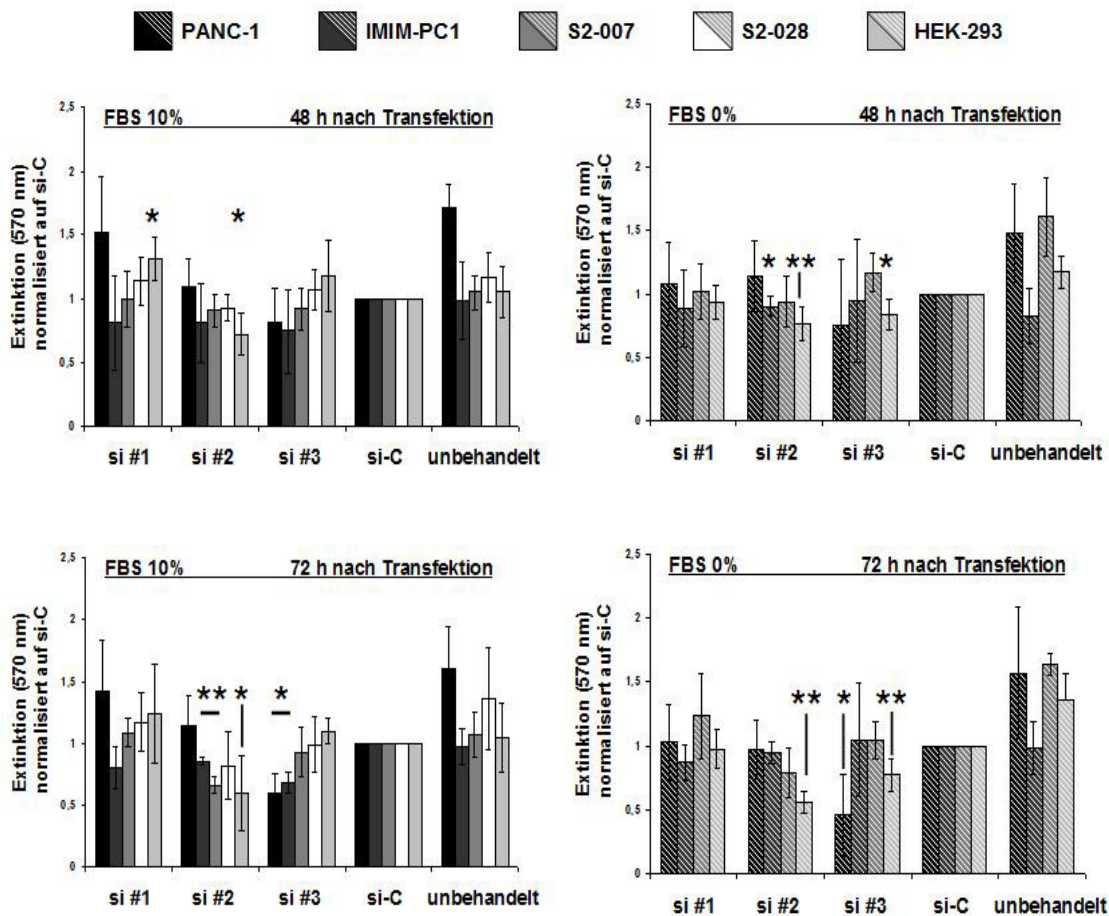


Abbildung 24: Regulation der Zellviabilität nach Repression von CFL1. 48 bzw. 72 h nach der siRNA-Transfektion wurden in An- bzw. Abwesenheit von FBS MTT-Assays durchgeführt. 48 h nach Transfektion zeigten sich keine (10 % FBS) bzw. nur schwache Effekte (0 % FBS) auf die Zellviabilität. 72 h nach Transfektion verstärkt sich der Effekt sowohl in An- als auch in Abwesenheit von FBS, allerdings sind die Einflüsse weniger deutlich als in den BrdU-Versuchen. Die Daten repräsentieren mindestens 3 unabhängige Versuche. si #1,2,3 = siRNA 1-3; si-C = „Non-silencing“-Kontrolle; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Da neben einer verminderten Zellviabilität auch eine gesteigerte Apoptoserate als Grund für eine abnehmende DNA-Syntheserate in Frage kommen kann, erfolgte zusätzlich zu den BrdU- und MTT-Assays eine Analyse der apoptotischen Kaskaden mittels Western Blot-Experimenten. Dazu wurden Antikörper gegen die Apoptose-Marker Caspase-3 und PARP verwendet. Diese Proteine werden im Falle eines Zelltodes gespalten und können somit apoptotische Vorgänge innerhalb der transfizierten Zellen anzeigen.

Die 5 verschiedenen Zelllinien wurden mit den 3 siRNAs sowie der „Non-silencing“-Kontrolle transfiziert und nach 72-stündiger Inkubation lysiert. Die aufgetrennten und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragenen Proteine wurden mit den spezifischen

Antikörpern für Caspase-3 sowie deren gespaltenen Form Cleaved Caspase-3 und einem PARP-Antikörper behandelt. Letzterer zeigte im Falle von apoptotischen Vorgängen auch das Spaltprodukt des Enzyms (89 kDa) an.

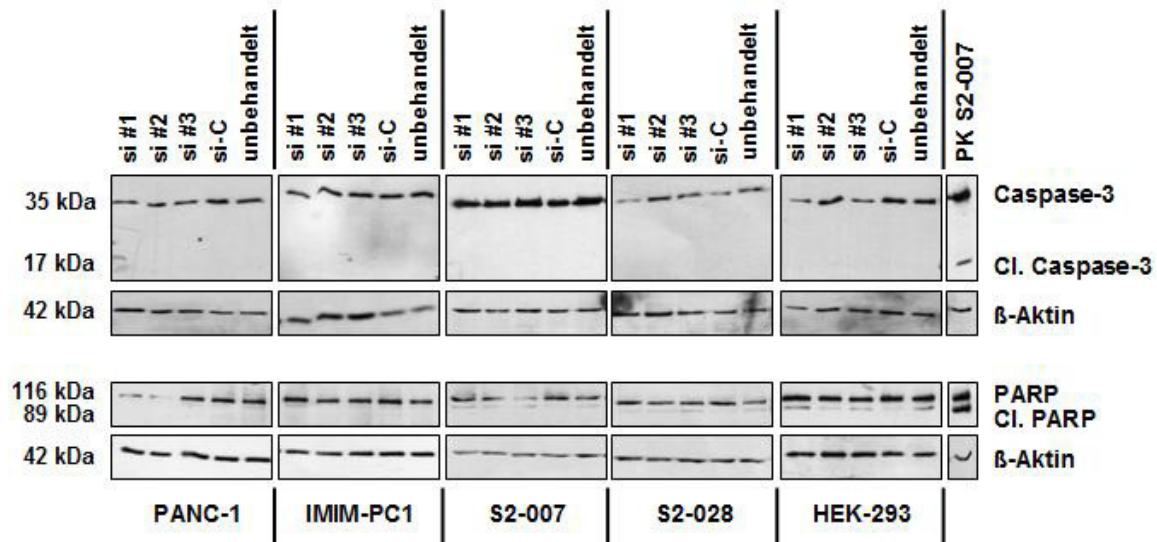


Abbildung 25: Keine Apoptose-Induktion nach Repression von CFL1. 48 h nach der Transfektion wurden die Gesamtprotein-Extrakte aus den Zellen isoliert und in Western Blot-Analysen mithilfe von Caspase-3-, Cleaved Caspase-3- und PARP-Antikörpern bezüglich ihrer Apoptose-Signale analysiert. Für alle Zelllinien zeigte sich, dass die Repression von CFL1 keine apoptotischen Effekte induziert. Eine Validierung der Ergebnisse erfolgte durch mindestens 3 unabhängige Experimente. si #1,2,3 = siRNA 1-3; si-C = „Non-silencing“-Kontrolle; PK = Positivkontrolle: UV-bestrahlte S2-007-Zellen.

Die Ergebnisse der Proben aus den einzelnen Zelllinien wurden mit der Positivkontrolle verglichen (Abb. 25). Hierbei handelte es sich um S2-007-Zellen, die für 10 min mit UV-Licht bestrahlt wurden. Wie man erkennen kann, wurden durch die Repression von CFL1 in keiner der Zelllinien apoptotische Vorgänge über das basale Grundlevel hinaus ausgelöst.

Um näheren Einblick in den Mechanismus der Wachstumsreduktion nach einer CFL1-Repression zu gewinnen, wurden für PANC-1- und S2-007-Zellen durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Dazu wurden die transfizierten Zellen mit Propidium-Iodid angefärbt. Dieser Farbstoff interkaliert mit der DNA, wodurch der DNA-Gehalt in den Zellen im Durchfluss-Zytometer gemessen werden kann. Durch die Analyse der Rohdaten mit der Software ModFit LT (Verity Software House, Topsham, USA) konnte der prozentuale Anteil an Zellen in den 3 Zellzyklusphasen G1, S und G2 bestimmt werden.

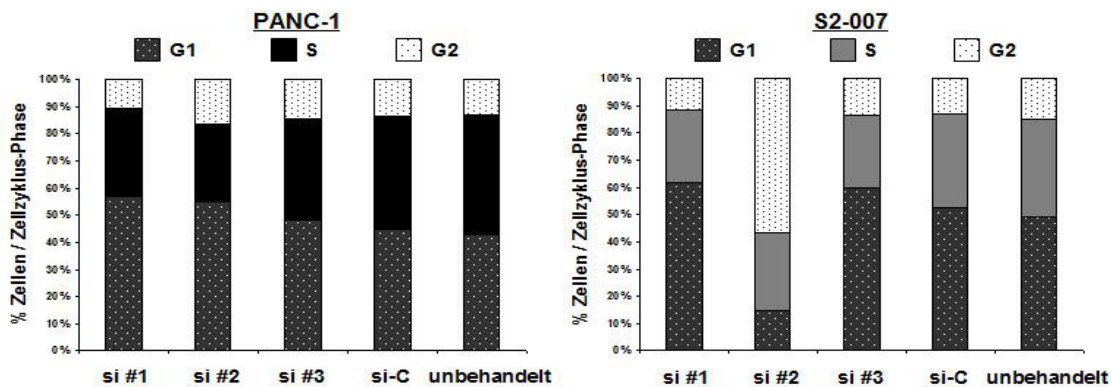


Abbildung 26: Analyse des Zellzyklus mittels Durchfluss-Zytometrie. Die Graphen zeigen exemplarische Ergebnisse für PANC-1- sowie S2-007-Zellen. Die Repression von CFL1 führte in PANC-1-Zellen zu einer reduzierten Anzahl an Zellen, die sich in der S-Phase befinden. Auch in S2-007-Zellen zeigte sich eine Reduktion der Zellen in der S-Phase. Außerdem konnte für siRNA #2 ein deutlicher G2/M-Phasen-Arrest beobachtet werden. si #1,2,3 = siRNA 1-3; si-C = „Non-silencing“-Kontrolle.

Exemplarische Ergebnisse für die Zelllinien PANC-1 und S2-007 sind in Abbildung 26 dargestellt (weitere Daten, vgl. Anhang, Abb. 38). In beiden Zelllinien wurde der Anteil an Zellen in der S-Phase durch die Transfektion mit den siRNAs im Vergleich zu den Kontrollzellen reduziert. Diese Ergebnisse sind mit denen der BrdU-Assays konform, da in diesen für die siRNA-Proben eine reduzierte DNA-Syntheserate festgestellt werden konnte. In S2-007 zeigte sich des Weiteren ein klarer G2/M-Phasen-Arrest im Falle der siRNA #2. Hier befanden sich über 50 Prozent der Proben in der G2-Phase, während die G1-Phase auf nahezu 10% reduziert wurde. Dieser Effekt konnte in 2 weiteren unabhängigen Versuchen reproduziert werden, war allerdings spezifisch für diese siRNA und die S2-007-Zellen. In PANC-1-Zellen zeigte sich hier zwar ebenfalls die stärkste Reduktion der S-Phase und eine Zunahme der G2-Phase, allerdings ließ sich nicht von einem G2/M-Phasen-Arrest sprechen. Auch die Ergebnisse der PANC-1-Zellen konnten in insgesamt 3 unabhängigen Versuchen reproduziert werden.

4.2.5 Die Repression von Cofilin-1 beeinflusst das substrat-unabhängige Wachstum der Zellen

Um festzustellen, ob die Repression von CFL1 auch die Karzinogenese beeinflusst, wurden Soft-Agar-Assays durchgeführt, bei der CFL1-reprimierte Zellen für mindestens 7 Tage umgeben von 0,33 %-igem Bacto-Agar kultiviert wurden.

Abbildung 27 A zeigt die quantitative Auswertung der Kolonienanzahl für die 3 verschiedenen Zelllinien PANC-1, S2-007 und S2-028 (s. Folgeseite). In allen 3

Zelllinien ergab sich ein inhibitorischer Einfluss der CFL1-Repression auf das substrat-unabhängige Wachstum. So wurde die Kolonienzahl nach der siRNA-Transfektion im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant reduziert. Dabei war auffällig, dass in den beiden SUT2-Zelllinien die siRNA #2 den stärksten Effekt ausübt, während dessen ihr Einfluss in den PANC-1-Zellen abgeschwächt war.

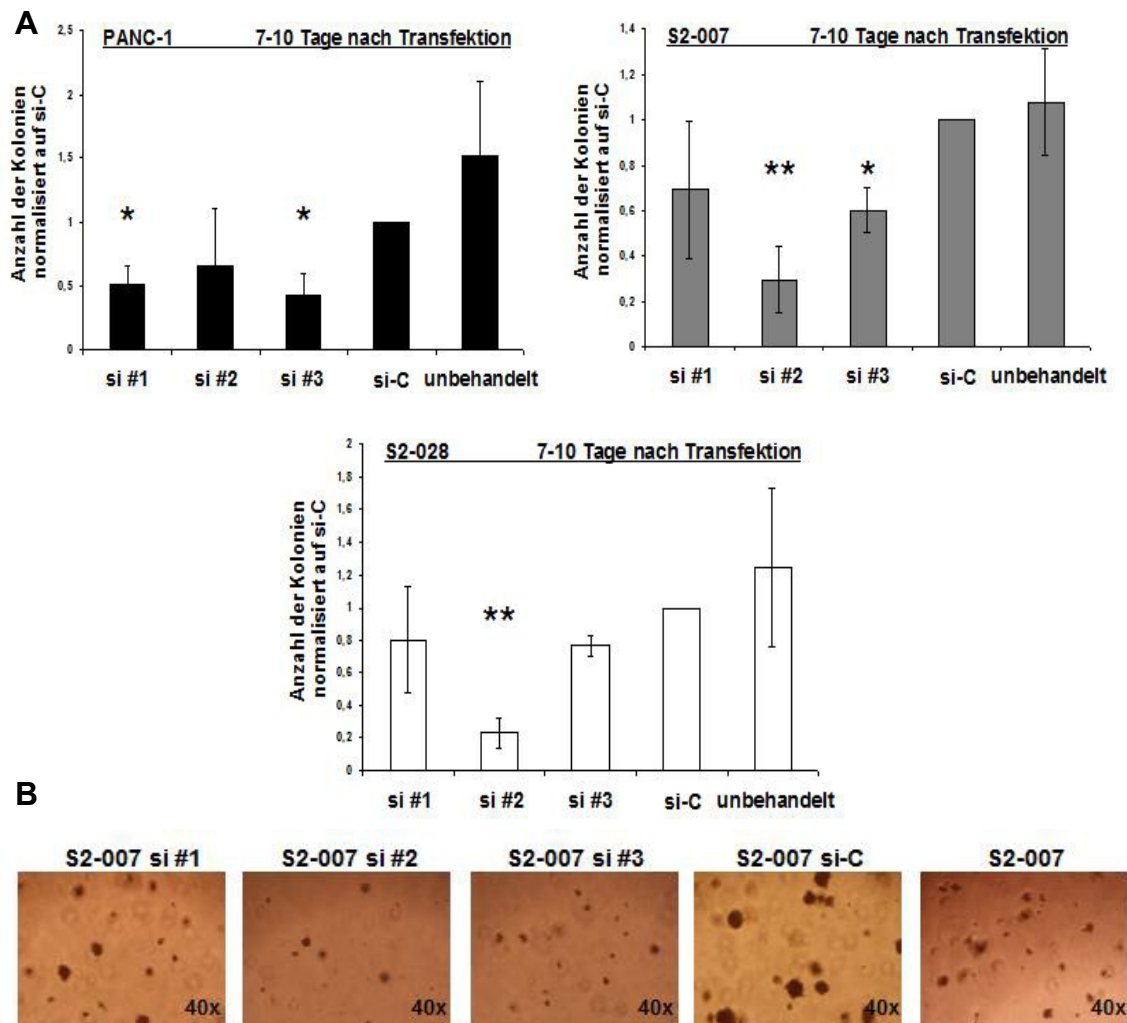


Abbildung 27: Eine verminderte CFL1-Repression beeinflusst das substrat-unabhängige Wachstum. Die mit siRNAs transfizierten Zellen wurden für mindestens 7 Tage in 0,33%-igem Soft Agar kultiviert. Die behandelten PANC-1-, S2-007- und S2-028-Zellen zeigten im Vergleich zur „Non-silencing“-Kontrolle eine signifikante Reduktion in der Koloniebildung (**A**). Des Weiteren war auch die Koloniegröße nach der CFL1-Repression vermindert (**B**). Dies ist hier exemplarisch für S2-007-Zellen dokumentiert. si #1,2,3 = siRNA 1-3; si-C = „Non-silencing“-Kontrolle; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Vergleicht man die Größe der Kolonien von den reprimierten Zellen zu den Kontrollzellen, so zeigte sich auch hier der Einfluss des herunterregulierten CFL1. Dies ist in Abbildung 27 B exemplarisch für S2-007-Zellen dargestellt. Es konnte festgestellt

werden, dass die Kolonien in den siRNA-Proben #2 und #3 deutlich kleiner waren als die der „Non-silencing“-Kontrolle. Derselbe Trend war für siRNA #1 zu erkennen, allerdings fiel der Effekt hier schwächer aus.

4.2.6 CFL1 hat spezifische Effekte auf das Migrationsverhalten der Karzinomzellen

Die zurzeit existierenden Publikationen über Cofilin-1 behandeln hauptsächlich dessen Einfluss auf die Zellmigration, während der Zusammenhang zwischen CFL1 und der Zytokinese selten analysiert wurde. Aufgrund dieser Tatsache wurde neben den oben beschriebenen Wachstumsversuchen auch ein Set von verschiedenen Migrations-Assays durchgeführt.

Zunächst wurden mittels „Time Lapse“-Analysen und Wundschluss-Assays die vorwiegend ungerichteten Zellbewegungen untersucht. Für die „Time Lapse“-Assays wurden pro Probe 20.000 - 40.000 transfizierte Zellen ausgesät. Nachdem sich die Zellen wieder an die Oberflächen angeheftet hatten, wurden sie über Nacht mit dem Mikroskop analysiert. Dazu wurden Videos der Zellen aufgenommen, die die Zellbewegungen der einzelnen Proben zeigten und anschließend mithilfe der „Open Source“-Software Time Lapse Analyzer (Huth et al. 2011) ausgewertet werden konnten.

Die nachfolgende Abbildung 28 zeigt die gemittelten, normalisierten Werte für die durchschnittlichen Migrationsgeschwindigkeiten für 4 verschiedene Zelllinien. Die Repression von CFL1 ergab in diesen Zelllinien für mindestens 2 der 3 siRNAs eine signifikante Verlangsamung der Zellen im Vergleich zu den kontroll-transfizierten Zelllinien. Wie schon in anderen Experimenten erkennbar, waren die Effekte in den SUIT2-Zellen am stärksten ausgeprägt. So wurde bei den S2-007-Zellen für 2 der 3 siRNAs das Signifikanzniveau erreicht, bei der Schwesterzelllinie S2-028 sogar für alle 3 siRNAs (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). Obwohl der Effekt in PANC-1- und IMIM-PC1-Zellen insgesamt schwächer ausfiel, wurde auch hier für einzelne siRNAs der Signifikanzlevel erreicht. Die Ergebnisse wurden für alle 4 Zelllinien 3-mal unabhängig reproduziert. Nachdem die Werte auf die „Non-silencing“-Kontrolle normalisiert wurden, erfolgte die in der Abbildung dargestellte Mittelwertbildung.

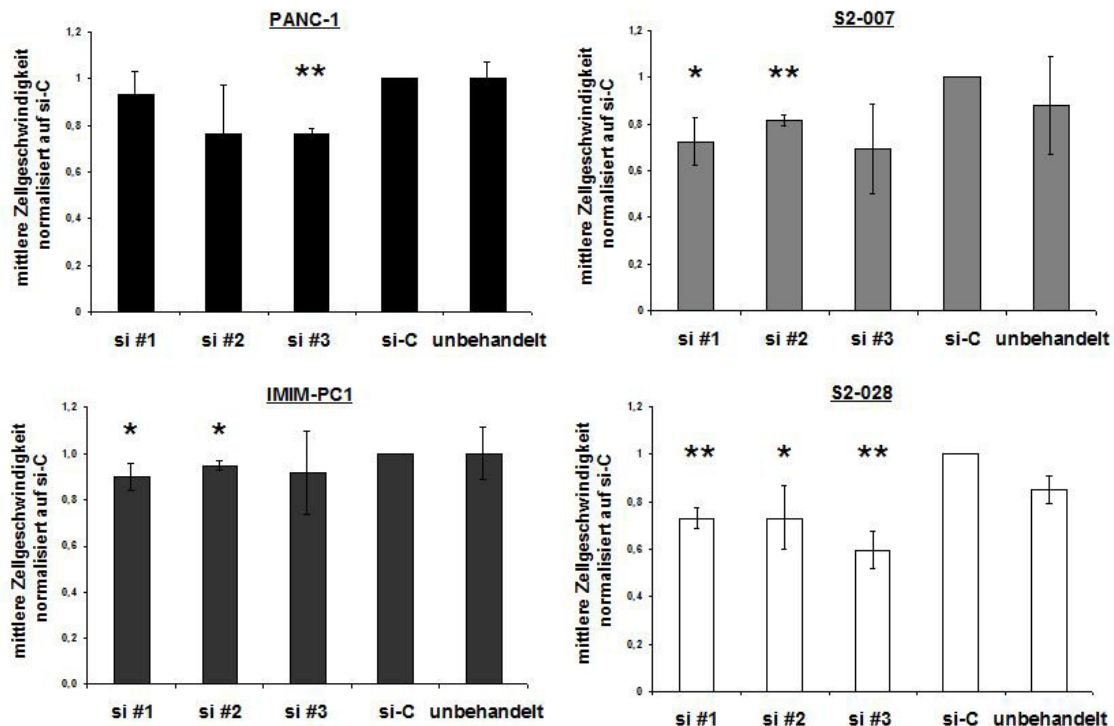


Abbildung 28: Die Regulation von CFL1 beeinflusst die Zellmotilität in „Time Lapse“-Analysen. Zur Untersuchung der Zellmigration wurden die transfizierten Zellen für 20 h im Zeiss Cell Observer® Fluoreszenz Mikroskop beobachtet. Dabei wurden im Abstand von 10 min von den unterschiedlich behandelten Zellen Fotos aufgenommen, die später mithilfe der Axiovision Software (Carl Zeiss GmbH) zu Videos vereint wurden (Bildanzahl = 121). Die Auswertung erfolgte mit der Software Time Lapse Analyzer (Huth et al. 2011). Die Abbildungen zeigen für die verschiedenen Zelllinien eine signifikante Verlangsamung der Zellbewegungen nach Repression von CFL1 im Vergleich zur „Non-silencing“-Kontrolle. Die Mittelwerte wurden aus den Ergebnissen von 3 unabhängigen Experimenten errechnet. si #1,2,3 = siRNA 1-3; si-C = „Non-silencing“-Kontrolle; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Mithilfe eines ähnlichen Versuchsschemas wurden die Wundheilungs-Assays durchgeführt. Dazu wurden in die 6-Loch-Platten hohe Zelldichten von 150.000 – 200.000 transfizierten Zellen ausgesät, um einen konfluenten Zellrasen zu erhalten. Zur Generierung der Wunde wurde dieser Zellrasen vor Beginn des Experiments mit einer 200 µl-Pipettenspitze von oben nach unten durchgezogen. Nachdem die Zellen mit frischem Medium überschichtet wurden, erfolgte auch hier die Videoaufnahme der Zellproben über 20 Stunden.

Die nachfolgende Abbildung 29 zeigt die Auswertung der Wundschluss-Geschwindigkeiten mithilfe der „Time Lapse Analyzer“-Software von 3 unabhängig reproduzierten Experimenten pro Zelllinie. Die Repression von CFL1 zeigte in diesen Experimenten in allen 3 Zelllinien eine tendenzielle Inhibition der Zellmotilität, wobei jeweils eine der 3 siRNAs einen signifikanten Effekt hervorrief (* = $p < 0,05$).

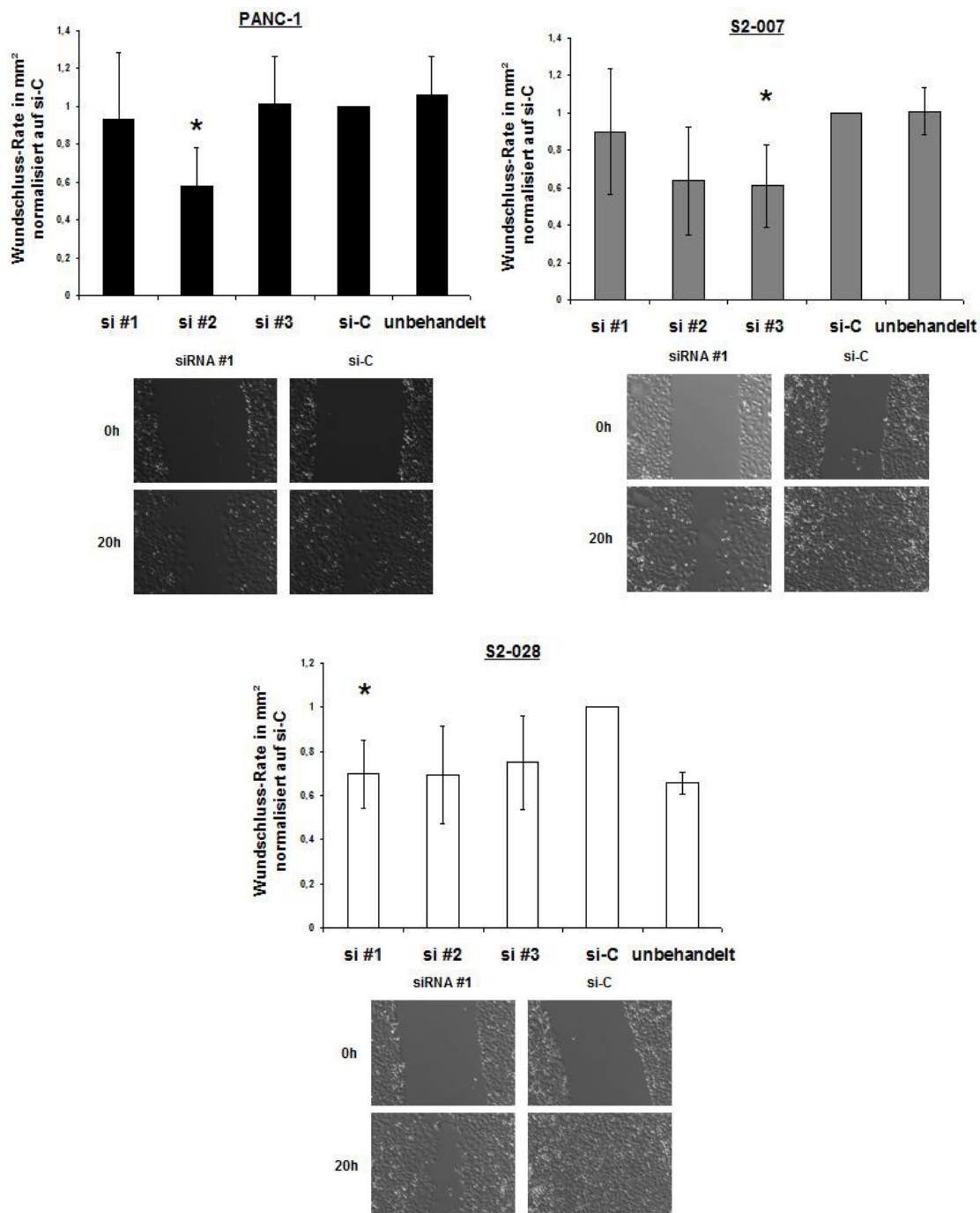


Abbildung 29: Die Regulation von CFL1 beeinflusst die Zellmotilität in Wundheilungs-Experimenten. Parallel zu den „Time Lapse“-Analysen wurde mit derselben Versuchsanordnung untersucht, ob die Repression von CFL1 den Wundschluss in einem konfluenten Zellrasen beeinflusst. Es zeigte sich, dass die reprimierten Zellen in ihren Zellbewegungen verlangsamt wurden. Die Ergebnisse erreichten für jeweils eine der 3 siRNAs Signifikanzniveau. Es wurden pro Zelllinie 3 unabhängige Durchgänge berücksichtigt. Die Mikroskopbilder zeigen exemplarisch jeweils für die siRNA1 und die „Non-silencing“-Kontrolle den Wundschluss. si #1,2,3 = siRNA 1-3; si-C = „Non-silencing“-Kontrolle; * = $p < 0,05$.

Als letztes Experiment im Set der Migrationsversuche wurde ein „Boyden Chamber“-Assay durchgeführt, um neben den oben beschriebenen Analysen der ungerichteten Migration auch die stimulus-gerichteten Zellbewegungen zu untersuchen. Bei diesem Experiment wird den Zellen eine Migration entlang eines Serumgradienten ermöglicht. Nach einer Inkubationszeit von 4-6 Stunden wurden die Zellen im Insert fixiert, angefärbt und bei 100-facher Vergrößerung fotografiert.

Diese Aufnahmen konnten mithilfe der „Time Lapse Analyzer“-Software ausgewertet werden. Des Weiteren wurden manuelle Kontrollzählungen mit der Software Image J durchgeführt, um fehlerhafte Software-Analysen ausschließen zu können.

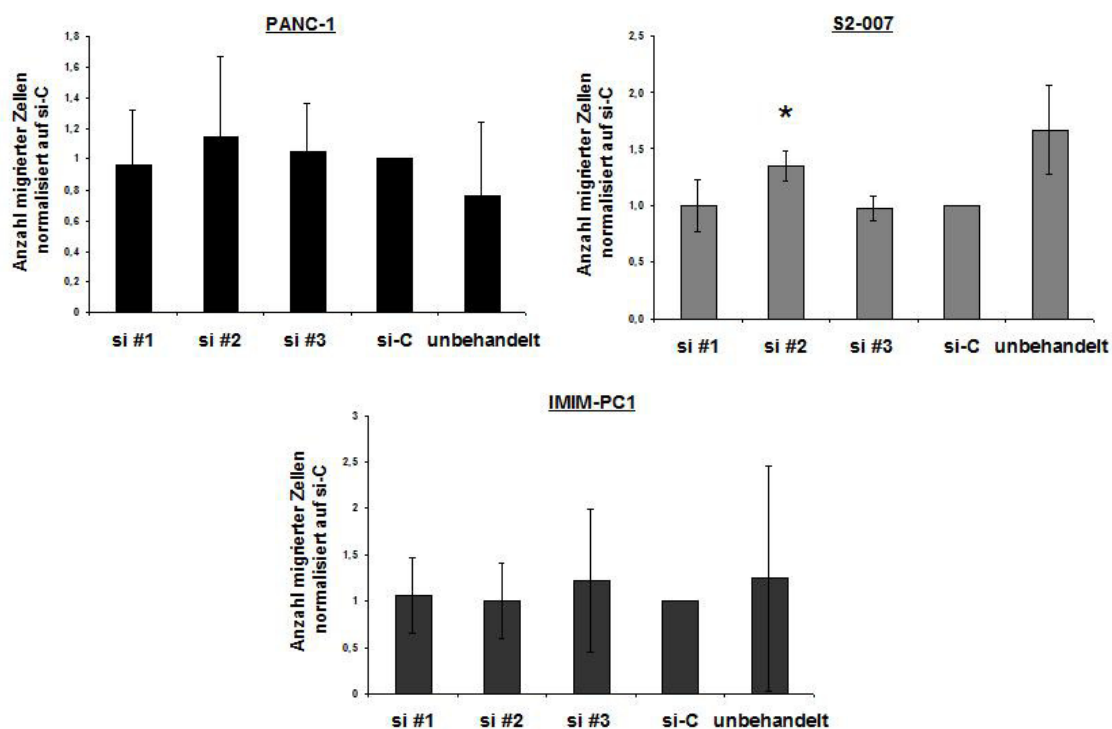


Abbildung 30: Eine verminderte CFL1-Expression hat keinen Einfluss auf die stimulus-gerichtete Migration. Nach der siRNA-Transfektion gegen CFL1 wurden „Boyden Chamber“-Experimente durchgeführt, in denen die behandelten Zellen für 4 h die Gelegenheit hatten, entlang eines Serumgradienten von der oberen Kammer (FBS 0 %) in die untere Kammer (FBS 1 %) zu migrieren. Die Evaluation der Daten (n = 3) zeigte, dass die CFL1-Repression keinen eindeutigen Einfluss auf die stimulus-gerichtete Migration hatte. si #1,2,3 = siRNA 1-3; si-C = „Non-silencing“-Kontrolle; * = $p < 0,05$.

In Abbildung 30 sind die Ergebnisse der „Time Lapse Analyzer“-Software für PANC-1-, S2-007- und IMIM-PC1-Zellen dargestellt. Wie sich zeigt, hatte die Repression von CFL1 keinen eindeutigen Einfluss auf die Zellen. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Migrations-Assays zeigte sich keine rückläufige Entwicklung der

Zellmotilität. Während der Effekt für IMIM-PC1-Zellen nahezu gegen Null ging, zeigte sich für die beiden anderen Zelllinien eher eine zunehmende Zellmotilität, die im Falle der siRNA #2 in S2-007-Zellen sogar Signifikanzniveau erreichte.

Die manuellen Kontrollzählungen zeigten das gleiche Bild wie die computergestützten Auswertungen des „Time Lapse Analyzer“-Programms.

4.2.7 Die induzierbaren S007-pTRIPZ-Klone zeigen *in vitro* eine hoch-signifikante Abnahme der Zellproliferation

Nachdem die RNAi-Experimente einen wachstumsregulatorischen Effekt von Cofilin-1 aufdecken konnten, erfolgte die Herstellung stabil transfizierter Klon-Zelllinien, um die Befunde auch *in vivo* bestätigen zu können. Dazu wurde der tetracyclin-induzierbare pTRIPZ-Vektor in S2-007-Zellen transfiziert und diese Zellen anschließend mithilfe von Puromycin selektioniert. Die so erhaltenen Einzelzellklone wurden expandiert und als Dauerkultur gehalten. Zusätzlich wurden frühe Passagen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zunächst wurde auf mRNA- und Proteinebene getestet, ob die Induktion dieser Zelllinien mit 2 μ M Doxycyclin zu einer signifikanten Repression des CFL1-Levels führt. Dazu wurden 3 verschiedene Klon-Zelllinien S007-pTRIPZ-CFL1-1.2, -1.3 und -1.4 sowie unbehandelte S2-007-Kontrollzellen in 6-Loch-Platten ausgesät und für 72 h in Doxycyclin-haltigem Medium kultiviert. Anschließend wurden sowohl Proteinlysate geerntet als auch RNA isoliert, um die CFL1-Expression im Vergleich zu uninduzierten Zellen zu bestimmen.

Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 31 dargestellt (s. Folgeseite). Die Induktion der Zellen auf mRNA-Ebene führte zu einer hoch-signifikanten Repression des CFL1-Levels (**A**). Im Vergleich zu den unbehandelten S2-007-Zellen konnte die Expression in allen 3 Zellklonen um 80-90 % reprimiert werden (Student's T-test: ** = $p < 0,01$; $n = 3$).

Auch der Vergleich zwischen induzierten und uninduzierten Klonzellen ergab einen signifikanten Rückgang der CFL1-Expression, auch wenn in den Zellklonen 1.2 und 1.4 die basale CFL1-Expression schon etwas niedriger ausfällt als in den unbehandelten Zellen. Im Gegensatz dazu hatte wie erwartet die Doxycyclin-Behandlung alleine keinen Einfluss auf die CFL1-Expression in den S2-007-Kontrollzellen ($p = 0,27$).

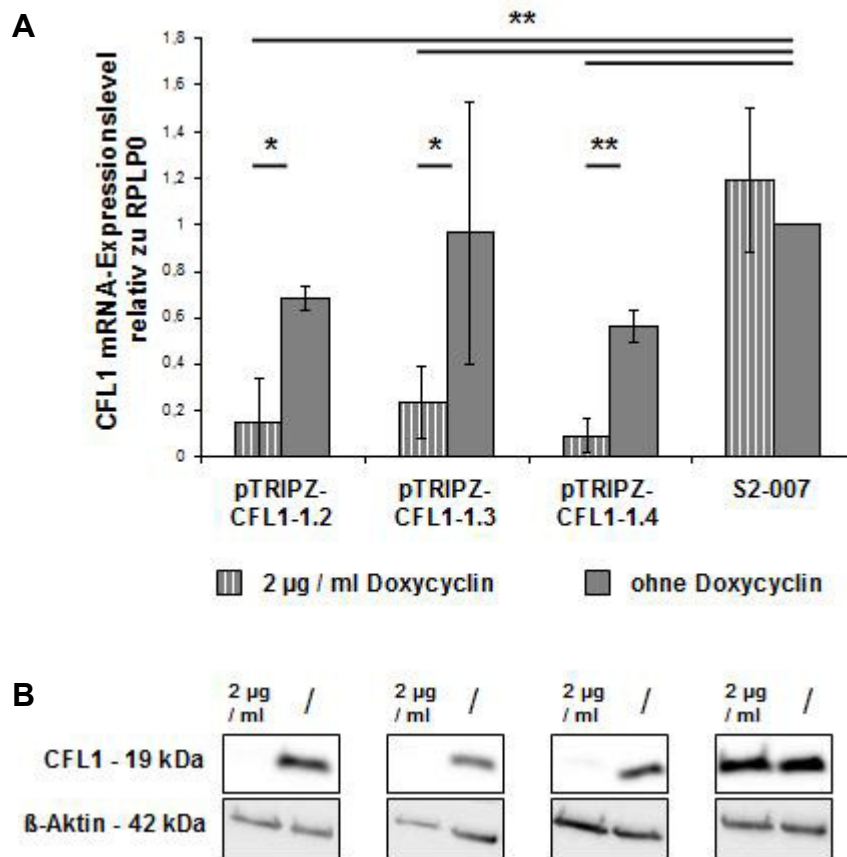


Abbildung 31: Analyse der CFL1-Expression auf mRNA- und Proteinebene nach stabiler Transfektion des induzierbaren CFL1-pTRIPZ-Konstruktes in S2-007-Zellen. A: Die Induktion der transfizierten S2-007-CFL1-pTRIPZ-Zellen mit 2 µg / ml Doxycyclin (gestrichelte Balken) führte zu einer hoch-signifikanten Repression des CFL1-Levels sowohl im Vergleich zu uninduzierten Zellen (grau ausgefüllte Balken) als auch zu unbehandelten S2-007-Zellen. Die Behandlung von S2-007-Zellen mit Doxycyclin führte dagegen zu keiner signifikanten Expressionsverminderung ($p = 0,27$). Die Daten wurden in 3 unabhängigen Experimenten reproduziert. **B:** Dieses Ergebnis konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden. Auch hier ergibt sich durch die Verabreichung von Doxycyclin eine starke Abnahme der CFL1-Expression. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Diese Befunde konnten durch Western Blot-Analysen auch auf Proteinebene bestätigt werden. Es zeigte sich ein deutlicher Rückgang der CFL1-Expression nach Induktion der Klonzellen mit Doxycyclin, während die Kontrollzellen unbeeinflusst blieben (**B**).

Bevor diese induzierbaren Zellklone für die *in vivo*-Experimente expandiert wurden, erfolgten 72 h nach Induktion *in vitro*-BrdU-Assays, um zu überprüfen, ob die in den transienten Experimenten ermittelten, rückläufigen DNA-Syntheseraten auch mit den stabil veränderten Zellklonen reproduziert werden können. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in nachfolgender Abbildung 32 dargestellt.

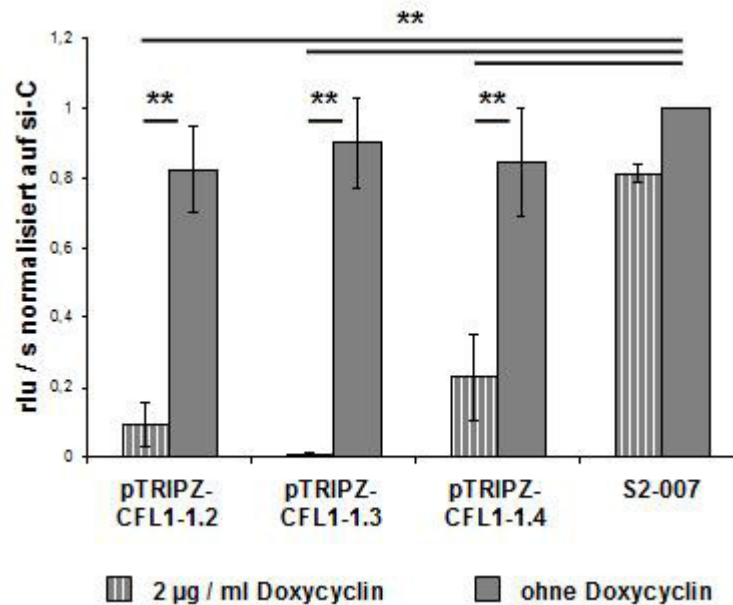


Abbildung 32: Analyse der Zellproliferation nach Induktion der S2-007-CFL1-pTRIPZ-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Die Ergebnisse der BrdU-Assays verdeutlichen einen hoch-signifikanten Rückgang der DNA-Syntheserate um 80 – 95 % nach Induktion der stabil transfizierten Zellen mit 2 µg / ml Doxycyclin. Ohne die Verabreichung von Doxycyclin zeigte sich dagegen keine signifikante Verminderung der Zellproliferation. Die dargestellten Mittelwerte beruhen auf den Ergebnissen aus 3 unabhängigen Durchgängen. ** = $p < 0,01$; rlu / s = relative light units / second.

Es konnte gezeigt werden, dass die Doxycyclin-Induktion in allen 3 Zellklonen 1.2, 1.3 und 1.4 zu einer hoch-signifikanten Abnahme der DNA-Syntheseraten führte (Student's T-test: ** = $p < 0,01$). Im Vergleich zu den unbehandelten S2-007-Kontrollzellen verminderten sich die Werte um 80-90 %. Für den Klon 1.3 zeigte sich sogar nahezu kein Zellwachstum mehr. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in diesen Zellen durch die CFL1-Repression apoptotische Kaskaden aktiviert wurden, die zum generellen Zelltod geführt haben. Es zeigte sich auch eine leichte Abnahme der DNA-Synthese, wenn die Kontrollzellen mit Doxycyclin behandelt wurden. Dieser Rückgang fällt aber im Vergleich zu den Klonzellen sehr viel schwächer aus und ist vermutlich auf eine geringe Toxizität der Doxycyclin-Behandlung zurückzuführen.

4.2.8 *In vivo*-Experimente zeigen keine Verlangsamung des Tumorstwachstums aufgrund nicht mehr nachweisbarer Repression in den S007-pTRIPZ-CFL1-Zellen

Auf Basis dieser Daten wurden die Zellklone expandiert, um sie in Xenograft-Experimenten subkutan in athymische Mäuse zu implantieren. Aufgrund der möglichen

Apoptose-Induktion wurde der Klon S007-pTRIPZ-CFL1-1.3 für diesen Versuch nicht verwendet, da die ermittelten BrdU-Ergebnisse möglicherweise auf Klonierungsartefakte zurückzuführen sind. Von den beiden anderen Zellklonen sowie von unbehandelten S2-007-Zellen wurden jeweils 2×10^6 Zellen pro Tier injiziert (3 Gruppen, $n = 12$).

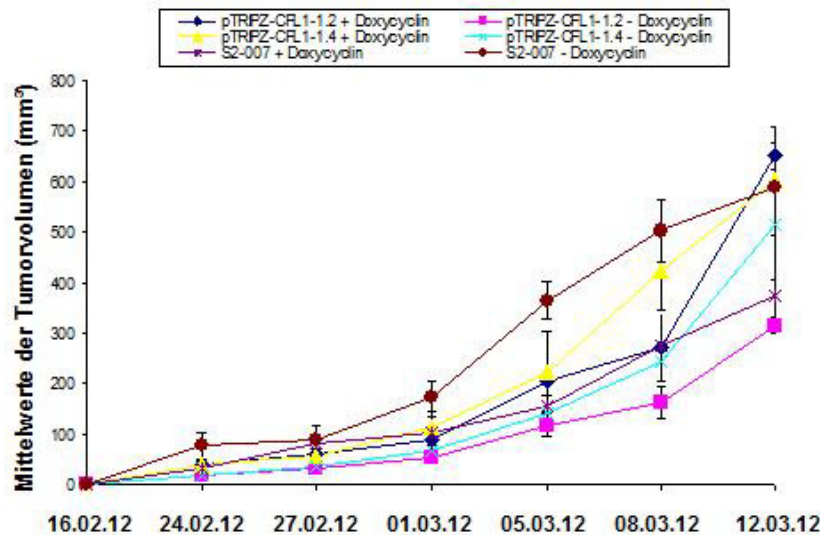


Abbildung 33: Ergebnisse der *in vivo*-Experimente mit 2 verschiedenen Klonen der S2-007-CFL1-pTRIPZ-Zellen sowie untransfizierten S2-007-Kontrollzellen. Athymischen Mäusen wurden jeweils 2×10^6 stabil transfizierte Zellen (pTRIPZ-CFL1-1.2 und pTRIPZ-CFL1-1.4) bzw. untransfizierte Kontrollzellen (S2-007) injiziert ($n = 12$). Ab dem darauf folgenden Tag wurde das Trinkwasser von jeweils 6 der Tiere mit 2 mg / ml Doxycyclin und 2 % Succrose angereichert. Nach 8 Tagen waren bei allen Tieren Tumore an den Flanken erkennbar, so dass mit der regelmäßigen Vermessung der Tumore begonnen wurde. Nach 6 Messungen ergab sich für keine der beiden Klon-Zelllinien eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums unter dem Einfluss von Doxycyclin. Im Gegenteil führte die Induktion der Zellen im Vergleich zu den uninduzierten Klonzellen sogar zu größeren Tumoren. $n =$ Anzahl der Tiere.

Die Abbildung 33 stellt die Ergebnisse dieses Experiments dar. Es ist erkennbar, dass die Doxycyclin-Behandlung im Vergleich zu den uninduzierten Zellen bei keiner der beiden Klonzelllinien eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums hervorrief. Entgegen der eigentlichen Erwartung schien die Induktion der CFL1-Repression das Tumorwachstum eher zu fördern. Auch im Vergleich zu den unbehandelten S2-007-Kontrollzellen zeigten die induzierten Zellen gesteigerte Tumorgößen.

Um zu überprüfen, ob in den länger passagierten Klonen noch eine Induzierbarkeit der CFL1-Repression gegeben war, wurden erneut *in vitro*-Versuche durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit Doxycyclin induziert und nach 4 verschiedenen Zeitspannen geerntet, um einen möglichen Verlust der Induzierbarkeit zu überprüfen.

Anschließend erfolgte die Ermittlung der CFL1-Expression auf Proteinebene im Vergleich zu uninduzierten Kontrollzellen.

Das Ergebnis der Western Blot-Analyse ist in Abbildung 34 dargestellt. Es zeigte sich, dass sich durch die Induktion im Zellklon S007-pTRIPZ-CFL1-1.2 zu keinem Zeitpunkt eine Cofilin-1-Repression ergab. Für den Klon 1.4 ergab sich zwar nach 60-stündiger Induktion eine Verminderung des CFL1-Levels, allerdings folgte dieser nach 72 h eine erneute Zunahme. Außerdem waren diese geringen Expressionsänderungen nicht mit den ursprünglich ermittelten Repressionsraten von ca. 80 % zu vergleichen (vgl. Abb. 31). Es ist daher zu vermuten, dass sich auch in den tierexperimentellen Versuchen keine Repression von CFL1 ergeben hat.

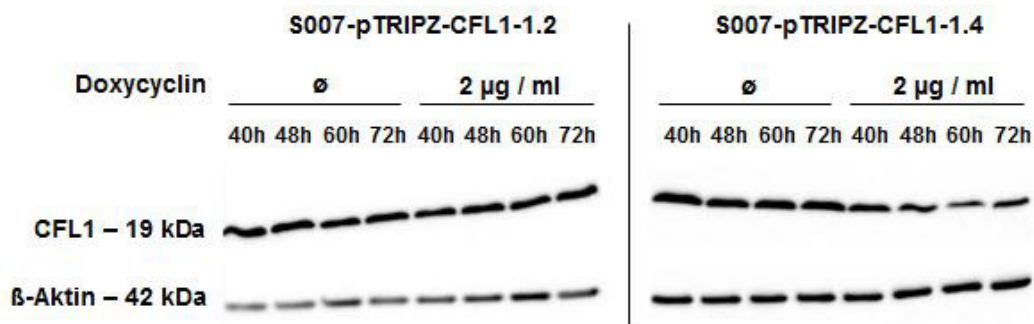


Abbildung 34: Zeitabhängige Analyse der CFL1-Expression auf Proteinebene in den induzierbaren Zellklonen S007-pTRIPZ-CFL1-1.2 und -1.4. Um zu untersuchen, ob in den für die Mausexperimente genutzten Zelllinien eine Repression der CFL1-Expression durch die Verabreichung von Doxycyclin induziert werden konnte, wurden Doxycyclin-behandelte und -unbehandelte Zellen zu 4 verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Die Western Blot-Analysen zeigten für den 1.2-Klon zu keinem Zeitpunkt einen verminderten CFL1-Level. Für den Klon 1.4 ergab sich nach 60 h eine leichte Abnahme, die allerdings mit dem ursprünglichen Repressionslevel nicht vergleichbar war (vgl. Abb. 31).

Basierend auf diesen Daten wurde vermutet, dass die Klonzelllinien 1.2 und 1.4 ihre Induzierbarkeit im Laufe der Kultivierung über multiple Passagen verloren haben könnten. Aufgrund dessen wurden Zellstocks der Klone aufgetaut, die aus Passage 8 stammten. Diese frischen Zellen wurden erneut mit 2 µg / ml Doxycyclin behandelt und nach 40 - 72 h für die Bestimmung des CFL1-Proteinlevels geerntet. Die Western Blot-Analysen zeigten, dass diese Zellen noch induzierfähig waren und nach 72 h im Vergleich zu den uninduzierten Zellen einen starken Rückgang der CFL1-Expression aufwiesen (vgl. Abb. 35, s. Folgeseite). Allerdings zeigt sich auch bereits hier im Vergleich zu den Zellen aus Passage 3-5 (Abb. 31) ein leicht abgeschwächter Effekt der Induktion.

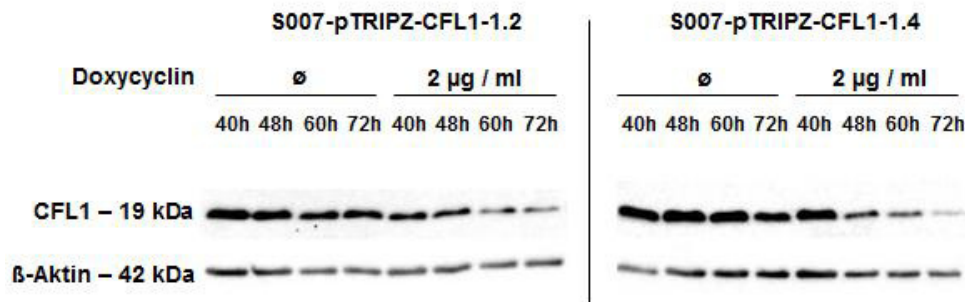


Abbildung 35: Auswirkung der Passage auf die Induzierbarkeit der Zellklone S007-pTRIPZ-CFL1-1.2 und -1.4. Frühere Zellpassagen der beiden Zellklone wurden in Kultur genommen, um zu überprüfen, ob die initial ermittelte Induzierbarkeit der Zellen reproduziert werden kann (vgl. Abb. 31). Die hier gezeigten Western Blots basieren auf Lysaten von Zellen aus Passage 8, während die Zellen aus Abbildung 34 hatten bereits Passage 12 erreicht hatten. Es ist erkennbar, dass in den hier verwendeten Zellen die Repression der CFL1-Expression in beiden Klonzelllinien induziert werden konnte.

Eine mögliche Ursache für die nachlassende Repression über die zunehmenden Passagen kann die Methylierung des Promotors des pTRIPZ-Vektors darstellen. Erfolgt diese, wird die Transkription der shRNA unterdrückt, wodurch der Gehalt der endogenen CFL1-mRNA unbeeinflusst bleibt. Dadurch wäre die Induktion mittels Doxycyclin in diesen Zellen wirkungslos. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Klonzellen hoher Passagen mit dem Hypomethylierungs-Reagenz 5-Aza-2-deoxycytidine in einer Konzentration von 1 µM über verschiedene Zeitspannen behandelt. Dieses Reagenz hemmt die DNA-Methyltransferase, die für die Methylierung der DNA verantwortlich ist, und verhindert somit eine Neu-Methylierung von Promotor-Sequenzen während der DNA-Synthese.

In Abbildung 36 A ist der Versuchsaufbau dieses Experiments dargestellt (s. Folgeseite). Die Zellen des Klons S007-pTRIPZ-CFL1-1.4 wurden für insgesamt 8 Tage kultiviert, um 3 verschiedene Behandlungs-Bedingungen zu testen.

Abbildung 36 B zeigt die Ergebnisse der Western Blot-Analyse. Die unterschiedlich behandelten Klonzellen wurden dabei mit Doxycyclin-behandelten und -unbehandelten S2-007-Kontrollzellen verglichen. Es zeigte sich ein deutlicher Effekt der „Aza“-Behandlung. In den Zellen, die kein 5-Aza-2-deoxycytidine-Reagenz erhalten hatten, zeigte sich durch die Doxycyclin-Behandlung nur einen sehr schwachen Effekt auf die CFL1-Expression. Wurden die Zellen allerdings mit 5-Aza-2-deoxycytidine behandelt, so stieg die doxycyclin-induzierte CFL1-Repression in Abhängigkeit der Dauer der „Aza“-Verabreichung.

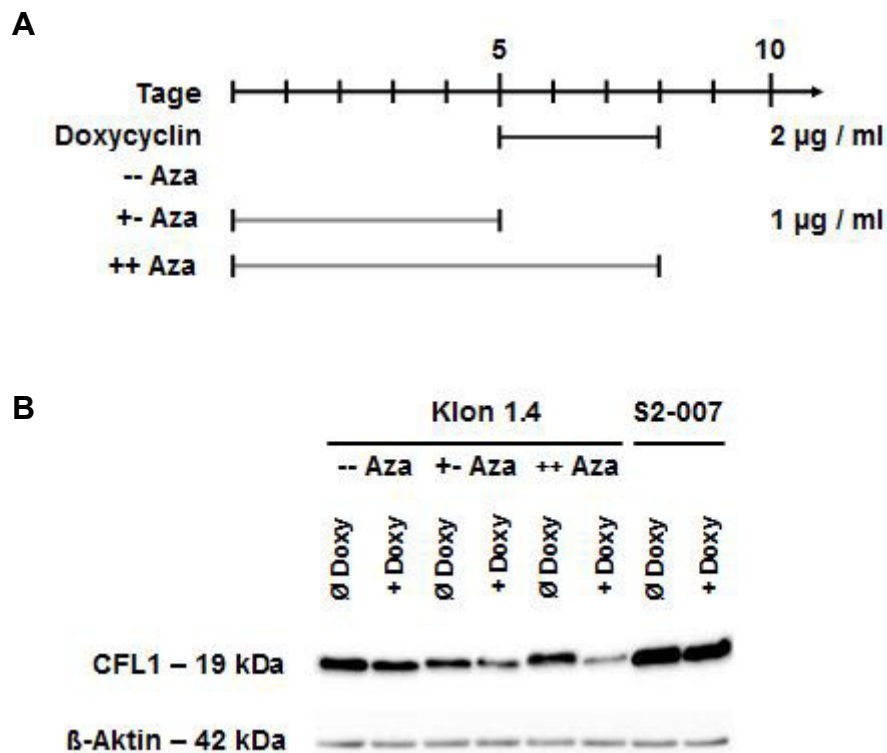


Abbildung 36: Einfluss von 5-Aza-2-deoxycytidine auf die Induzierbarkeit des Zellklons S007-pTRIPZ-CFL1-1.4. Um zu analysieren, ob die über die Passagen verlorene Induzierbarkeit der Klonzelllinie auf eine Methylierung des Promotors zurückzuführen ist, wurden die Zellen zusätzlich zur Doxycyclin-Gabe (2 µg / ml) mit 5-Aza-2-deoxycytidine behandelt. **A:** Schema des Versuchsaufbaus. -- Aza = kein 5-Aza-2-deoxycytidine über 8 Tage; +-Aza = 5-Aza-2-deoxycytidine von Tag 1-5, danach Entzug des Reagenz; ++ Aza = 5-Aza-2-deoxycytidine von Tag 1-8. **B:** Immunologischer Nachweis der CFL1-Expression auf Proteinebene mittels eines anti-CFL1-Antikörpers (1:1.000). Im Vergleich zu „Aza“-freien Klonzellen, zeigten die mit 5-Aza-2-deoxycytidine behandelten Zellen unter Doxycyclin eine deutliche Repression der CFL1-Expression. Unbehandelte S2-007-Zellen dienten als Kontrollzellen.

5 DISKUSSION

Das Pankreaskarzinom stellt in den Industriestaaten aufgrund seiner schlechten Prognose und der in der Regel späten Diagnostik die viert-tödlichste Krebserkrankung dar (Jemal et al. 2007, Loos et al. 2008). Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, neue Zielgene aufzudecken, die als Ansatzstellen für eine verbesserte Therapie und Diagnose dieser Tumorart dienen können. Bis zur Entwicklung der „Reverse Transfection“-Technologie durch Ziauddin und Sabatini (2001) mussten funktionelle Untersuchungen meist in langwierigen Einzelversuchen durchgeführt werden. Durch die neue Methodik wurde dagegen eine Analyse in einem parallelisierten Verfahren ermöglicht. Da eine Immobilisierung von cDNA-Konstrukten der zu untersuchenden Gene auf Glasobjektträgern erfolgt, die anschließend mit Zellen übersät werden, ist diese Methode für alle gängigen, zellbasierten Assays zugänglich (vgl. Kap. 1.3.2, 3.2.2 und 3.2.3) (Mannherz et al. 2006).

Aus diesem Grund wurde die Technologie ausgewählt, um sie in unserem Labor zu etablieren und sie für die parallelisierte Charakterisierung potentieller neuer Zielgene des Pankreaskarzinoms zu nutzen. Dabei sollten die Genfunktionen analysiert und letztendlich eine Vorauswahl solcher Gene ermöglicht werden, die für eine detaillierte Einzelcharakterisierung am geeignetsten erscheinen.

5.1 DIE REVERSE TRANSFEKTION ALS ANALYSE-METHODE FÜR GENETISCHE FUNKTIONEN

5.1.1 Etablierung und Modifikation des ursprünglichen „Reverse Transfection“-Protokolls für die Analyse von Kandidatengenen des Pankreaskarzinoms

Für die vorangegangenen Publikationen, in denen die „Reverse Transfection“-Technologie zum Einsatz kam, wurden größtenteils HEK-293- und HeLa-Zellen als Modellsysteme verwendet (Ziauddin & Sabatini 2001, Mannherz et al. 2006, Silva et al. 2004). Diese Zelllinien haben die Eigenschaft gemein, dass sie mittels gängiger Protokolle relativ leicht zu transfizieren sind. Die für die hier vorliegende Studie verwendeten Zelllinien des Pankreaskarzinoms PANC-1 und S2-007 weisen im Vergleich i.d.R. deutlich schlechtere Transfektionsraten auf. Um mithilfe der reversen

Transfektion auch für dieses Modellsystem annehmbare Transfektionseffizienzen zu erzielen, wurde eine Optimierung des ursprünglichen Protokolls notwendig.

Die Transfektionseffizienz spielt dabei sowohl in Bezug auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, als auch für die praktische Auswertung der Microarrays eine große Rolle. Ohne eine ausreichende Anzahl transfizierter Zellen werden beispielsweise ein Wiederfinden der Positionen und die damit verbundene korrekte Zuordnung stark erschwert. Des Weiteren verleiht eine höhere Effizienz der Lokalisationsbestimmung und den funktionellen Analysen ein höheres Gewicht, da die Auswertung auf die Signale mehrerer Einzelzellen zurückzuführen ist. Um diese Effizienz überwachen zu können, wurden anstelle des von Ziauddin und Sabatini verwendeten GFP-Konstrukts die CFP- und YFP-Fusionsproteine als Reportersystem verwendet. Diese haben im Vergleich zum GFP-Protein den Vorteil, dass sie jeweils an einen der beiden Termini der zu untersuchenden Proteine fusioniert werden können (CFP = N-terminal, YFP = C-terminal) und diese Fusion in einem einzigen Klonierungsschritt stattfinden kann. Im Gegensatz dazu muss sich beim GFP-Protein vor einer Fusion für eine der beiden Positionen entschieden werden. Es zeigte sich dabei, dass die Bildung mancher Fusionsproteine gestört werden kann, wenn die Anlagerung am falschen Terminus erfolgt. Daraus können artifizielle Lokalisationen resultieren. Diese Problematik kann durch die CFP- und YFP-Konstrukte umgangen und Konstrukt-abhängige Artefakte besser identifiziert werden (Simpson et al. 2000).

In früheren Publikationen wurden auch Probleme in Bezug auf den eigentlichen Versuchsablauf von Ziauddin und Sabatini beschrieben (Mannherz et al. 2006). Hier zeigte sich, dass die Effizienz der Transfektion gesteigert werden kann, wenn die cDNA-Gelatine-Mischung schon vor der Immobilisierung auf den Objektträgern mit dem Transfektionsreagenz komplexiert wird, anstatt dieses nachträglich auf die Microarrays aufzubringen. Aufgrund dessen wurde diese Modifikation für die Etablierung der reversen Transfektion in Bezug auf das pankreatische Modellsystem adaptiert.

Nachdem sowohl das Reportersystem als auch das eigentliche „Spotting“-Verfahren für die Analysen ausgewählt waren, wurden zuletzt sowohl die Gelatine- als auch die DNA-Konzentration für die Zelllinien des Pankreaskarzinoms optimiert. Die Gelatine im Reaktionsansatz unterstützt die Komplexierung des Transfektions-Reagenz mit der Plasmid-DNA und hilft, eine Translokation des Spots auf dem Array zu vermeiden. Es zeigte sich, dass eine Konzentration von 0,2 % Gelatine die besten Ergebnisse lieferte.

Bei dieser Menge konnte ein Ablösen der Spots bei der Aussaat der Zellen verhindert werden, wie es bei niedrigeren Konzentrationen der Fall war. Höhere Konzentrationen waren dagegen ungünstig, da diese in einem unpräzisen Spotting resultierten. Bezüglich der DNA-Konzentration ergaben sich die besten Ergebnisse bei einer Konzentration von 4 µg. Diese vergleichbare hohe Menge ergab sich aus der Anwendung des Tecan Miniprep 75 zur Herstellung der Microarrays. Bei diesem Verfahren sind die Spotgrößen mit 0,5 bis 2 mm größer als in den früher publizierten Anwendungen (Ziauddin & Sabatini 2001, Conrad et al. 2004, Mannherz et al. 2006). Dadurch ist auf den einzelnen Spots eine entsprechend größere Anzahl von Zellen niedergelassen, wodurch die DNA-Menge an diese Bedingungen angepasst wurde. Die Gesamtheit dieser Modifikation führte in den Zellen PANC-1 und S2-007 für den Großteil der Konstrukte zu einer Transfektionseffizienz von ca. 50 %. Im Vergleich zu einer „forward“-Transfektion sind diese Werte vergleichsweise niedrig. Allerdings sind sie ausreichend für die Durchführung der Hochdurchsatzanalysen, da hier durch die Fusion der Genprodukte mit Fluoreszenzmarkern ein direkter Vergleich zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen auf einem begrenzten Areal stattfinden kann. Des Weiteren liegen diese Effizienzen im Bereich der Werte, die in früheren Studien für leichter zu transfizierende Zellsysteme beschrieben wurden (Mannherz et al. 2006, Conrad et al. 2004), so dass von einer erfolgreichen Optimierung des „Reverse Transfection“-Protokolls gesprochen werden kann.

5.1.2 Die parallelisierten Überexpressionsanalysen mittels reverser Transfektion identifizieren reproduzierbare Effekte für 19 Kandidatengene

Die Optimierung des Protokolls ermöglichte eine Analyse der Überexpressionseffekte, die sich durch die Transfektion der Fusionskonstrukte in den Zellen ergab. Dabei konnten die „Live Cell Microarrays“ zunächst bezüglich ihrer subzellulären Lokalisation ausgewertet werden. Durch die generierten Effizienzen von 50 % und die damit verbundene Reproduzierbarkeit der Daten war dies für nahezu alle Genprodukte in den drei Zelllinien HEK-293, PANC-1 und S2-007 möglich (vgl. Anhang, Tab. 43-46). Im Anschluss an diese Lokalisationsbestimmung konnten die Microarrays mit verschiedenen Antikörpern behandelt werden, um die jeweiligen Genfunktionen zu ermitteln. Hier waren nicht alle Korrelationen zwischen den Fluoreszenzsignalen der Fusionskonstrukte und denen der Antikörper reproduzierbar.

Dieses Ergebnis verdeutlicht die Nachteile der parallelisierten Untersuchungsmethode. Zum einen ist die Methode im Vergleich zu einzeln durchgeführten Charakterisierungen weniger sensitiv. So besteht die Möglichkeit, dass potentiell interessante Ergebnisse nicht erfasst werden, weil die Effektgröße nicht ausreichend ist oder sie nicht ausreichend validiert werden können. Auch die Gefahr von falsch-positiven Ergebnissen kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, sondern durch reproduzierte Daten nur minimiert werden. Dieser Nachteil wird allerdings durch den Vorteil kompensiert, dass durch die reverse Transfektion sowohl Zeit als auch Ressourcen eingespart werden können.

Die erste Analyse der gesammelten Daten führte zu einer Auswahl von 19 Kandidaten aus dem Kollektiv von letztendlich 91 Genen, für die in den parallelisierten Überexpressions-Experimenten reproduzierbare und auffällige Ergebnisse dokumentiert werden konnten. Nach einer umfassenden Literaturrecherche wurden 7 dieser Gene allerdings von weiteren Analysen ausgeschlossen, da hier bereits verschiedene Forschungsergebnisse vorlagen oder eine Bearbeitung durch andere Arbeitsgruppen bekannt war. Für die übrigen 12 Gene wurden umfangreiche Validierungsassays durchgeführt, die die in den parallelisierten Experimenten ermittelten Daten festigen oder erweitern konnten. Eine endgültige Validierung aller Überexpressions-Daten führte letztendlich zu einer Auswahl von 8 Genen, die für weiterführende Einzel-Charakterisierungen am geeignetsten erschienen.

Zu Beginn der Versuchsplanung war eine Anwendung der reversen Transfektion auch in Verbindung mit der RNAi-Technologie geplant. Im Verlauf der Arbeit stellte sich allerdings heraus, dass dieses Vorhaben nicht realisierbar war. Dies war in der Tatsache begründet, dass fluoreszenzmarkierte siRNAs sehr kostenintensiv sind und diese Markierung deshalb in der Regel nicht erfolgt. Allerdings wäre durch die fehlende Fluoreszenz zum einen ein Wiederfinden der Spots erschwert gewesen, zum anderen hätte die Transfektionseffizienz nicht abgeschätzt werden können. Die erstgenannte Problematik hätte zwar durch eine Co-Transfektion mit einem Fluoreszenzmarker umgangen werden können, allerdings wäre die Transfektionseffizienz auch dann nur indirekt zu ermitteln gewesen. Da die Transfektionseffizienzen für die Überexpressions-Analysen mit 50% nur mittelmäßig waren, konnte auch für die RNAi-Analysen von keinem besseren Ergebnis ausgegangen werden.

Aufgrund dessen wurde letztendlich beschlossen, diesen Teil der Experimente im herkömmlichen „forward“-Verfahren zu bearbeiten. Dafür erfolgte eine Transfektion von

106 unmarkierten siRNA-Pools mithilfe des SilentFect-Reagenz in 96-Loch-Platten. Zwar konnten mit dieser Methode aufgrund der fehlenden Fluoreszenzmarkierung durch die Repression ausgelöste morphologische Veränderungen in den Zellen nur schwierig nachverfolgt werden, allerdings war eine Behandlung mit den verschiedenen Antikörpern in Bezug auf die funktionellen Analysen möglich. Außerdem wurden in vorangegangenen Einzelstudien der letzten Jahre Transfektionsprotokolle etabliert, mit denen gute Effizienzen erwartet werden konnten. Da sich teilweise auf der Plastikoberfläche der Platten Probleme in Bezug auf die Antikörperspezifität ergaben, wurden in diesem Teil der Analyse nicht alle Assays aus den Überexpressions-Experimenten wiederholt, sondern nur einzelne Versuche wie der Einfluss der Repression auf die Differenzierung hinzugefügt. Aus diesen Repressionsversuchen ergaben sich schließlich 2 weitere Gene, die auffällige und reproduzierbare Effekte aufwiesen.

Letztendlich wurden mithilfe dieser Vorgehensweise 10 Gene aus dem Kollektiv der Kandidaten für Folgeversuche selektiert. Auf Basis der hier vorgestellten Daten kann geschlussfolgert werden, dass die parallelisierte Überexpressionsanalyse mit der Methodik der reversen Transfektion prinzipiell möglich ist. Ob allerdings eine verlässliche Vorhersage möglich ist, welche Kandidatengene eines Kollektivs für eine Einzelcharakterisierung am geeignetsten sind, muss anhand von detaillierten Folge-Analysen für diese 10 Gene ermittelt werden. Diese Schlussfolgerung gilt dagegen nicht für die Repressionsanalyse. Aus den oben genannten Gründen war eine parallelisierte RNAi-Analyse der Kandidatengene mit dem hier vorgestellten Verfahren nicht möglich.

5.2 DAS KANDIDATENGEN CFL1

5.2.1 Die Repression von Cofilin-1 führt im Pankreaskarzinom zu einer bisher nicht beschriebenen Regulation des Zellwachstums

Wie im Ergebnisteil beschrieben, wurde auf Basis der Hochdurchsatz-Experimente ein wachstumsfördernder Effekt der CFL1-Expression in Pankreaskarzinomzellen postuliert. Verschiedene Expressionsanalysen auf mRNA- und Proteinebene zeigten zudem, dass Cofilin-1 in Geweben des Pankreaskarzinoms im Vergleich zu gesundem Gewebe signifikant überexprimiert ist, wodurch die Hypothese einer klinisch

relevanten, funktionellen Rolle dieses Gens im Pankreaskarzinom formuliert werden konnte. Eines der Ziele dieser Arbeit war es daher, in nachfolgenden Detaillanalysen die CFL1-induzierte Wachstumsregulation zunächst zu validieren und die beteiligten Mechanismen zu charakterisieren.

BrdU- und MTT-Assays mit PANC-1-Zellen, in denen die rekombinanten CFL1-Fusionsproteine überexprimiert wurden, bestätigten die Ergebnisse der parallelisierten Experimente. Zugleich dokumentierten diese Assays in CFL1-reprimierten Zellen den gegenteiligen Effekt in Form einer Wachstumsinhibition. Des Weiteren wurde durch die CFL1-Repression ein inhibierender Effekt in Bezug auf das substrat-unabhängige Wachstum festgestellt. Ein Zelltod der behandelten Zellen konnte dagegen durch Western Blot-Analysen bezüglich der Spaltung der Apoptosemarker Caspase-3 und PARP ausgeschlossen werden.

Wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben, ist der Einfluss der Cofilin-Expression auf die Zytokinese seit geraumer Zeit Gegenstand der Forschung bezüglich des Zusammenspiels zwischen CFL1 und dem Aktinzytoskelett. Allerdings beschränken sich diese Studien weitgehend auf die Oogenese verschiedener Modellorganismen. Obwohl ein aggressives Zellwachstum ein Charakteristikum maligner Zellen darstellt, wurde der Einfluss auf die Karzinogenese bisher nur vereinzelt untersucht.

Bereits 1993 wurden von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen Untersuchungen an der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt, in denen das homologe Hefe-Protein zum humanen Cofilin-1, COF1, eine inaktivierende Mutation aufwies. In den Experimenten zeigte sich ein lethaler Effekt, der darauf zurückgeführt wurde, dass sich die Hefezellen niemals teilten (Iida et al. 1993, Moon et al. 1993). Weitere Folgestudien an *Drosophila melanogaster* und *Xenopus laevis* lieferten erste Hinweise, welche Prozesse an dieser inkorrekten Zellteilung beteiligt sind. So beobachteten Gunsalus und Kollegen (1995) anhand von Mutationen des *Drosophila-twinstar*-Gens, dass durch die aberrante Expression dieses Cofilin-Homologs die Zytokinese gestört wird, indem in der Prophase keine korrekte Chromosomenseparation stattfindet. Außerdem beschrieben sie einen gestörten Abbau der Aktinfilamente, die in der späten Telophase den kontraktilen Ring bilden. Dieser entsteht in der Endphase einer Zellteilung zwischen den sich bildenden Tochterzellen im Bereich der Teilungsfurche (engl. cleavage furrow), entlang derer sich die Zellen letztendlich voneinander abschnüren (Cao & Wang 1990, Glotzer 2005). Dieselben Beobachtungen wurden auch für *Xenopus laevis* nach Mutation der Cofilin-homologen Proteine XAC 1 & 2 gemacht

(Abe et al. 1996). Basierend auf diesen Experimenten wurde der Mechanismus postuliert, dass Cofilin während der Zellteilung an der Abschnürung der Tochterzellen mitwirkt, indem es die in den Bereichen der Teilungsfurche vorliegenden Aktinfilamente destabilisiert und somit zu ihrem Abbau führt (Glotzer 2005).

Obwohl ein wachstumsregulierender Effekt der CFL1-Expression auch in den Pankreaskarzinomzellen beobachtet werden konnte, muss der Mechanismus hier ein anderer sein. Dafür sprechen die durchflusszytometrischen Analysen in CFL1-reprimierten PANC-1- und S2-007-Zellen. Im Falle eines gestörten Abbaus des kontraktilen Rings würde man einen Arrest der Zellen in der G2-Phase erwarten.

Wie sich zeigte, war dies aber bis auf den Sonderfall der siRNA #2 in S2-007-Zellen nicht zu beobachten. Alle anderen Versuchsbedingungen resultierten lediglich in einer reduzierten Anzahl von Zellen in der S-Phase, nicht in einem typischen Arrest. Dies bedeutet, dass der reprimierte CFL1-Level bereits zu einem früheren Zeitpunkt als der Telophase in die Zellteilung eingreift. Da der durch die Behandlung mit siRNA #2 auftretende G2/M-Phasen-Arrest spezifisch für die S2-007-Zellen und für diese spezielle siRNA ist, handelt es sich bei diesem Ergebnis mit großer Wahrscheinlichkeit zumindest zum Teil um unspezifische Wirkungen der verwendeten siRNA, sog. „off-target effects“. Die beobachtete Reduktion des Anteils von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus spiegelt dagegen die Ergebnisse der BrdU-Assays wieder. Die Aufklärung des genauen Mechanismus, der zu diesem Ergebnis führte, bedarf allerdings weiterer Experimente und ist auf Basis der vorliegenden Daten noch nicht möglich.

Wie bereits erwähnt, wurde der wachstumregulierende Effekt von Cofilin-1 im Zusammenhang mit Krebserkrankungen bisher kaum beschrieben. Lediglich an einem Modell des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms erfolgte bisher eine nähere Untersuchung dieser Vorgänge (Tsai et al. 2009). Allerdings sind auch die dort beschriebenen Resultate nicht mit den hier beobachteten Ergebnissen vereinbar. Die Arbeitsgruppe generierte stabile, tetrazyklin-induzierbare Überexpressionsklone der Zelllinie H1299 (HCOXP-Klone), um die Effekte des veränderten CFL1-Levels überprüfen zu können. Es zeigte sich, dass die Induktion der CFL1-Überexpression die Zellen in der G1-Phase arretieren lässt, während uninduzierte Kontrollzellen stetig proliferierten. Weiterhin konnten sie zeigen, dass A549-Zellen mit einem hohen endogenen CFL1-Level ebenfalls einen G1-Arrest aufwiesen, der durch die Behandlung der Zellen mit einer CFL1-siRNA aufgehoben werden konnte.

Zwei weitere Studien beschreiben indirekt den Einfluss von Cofilin-1 auf das Zellwachstum von Karzinomzellen. Kaji et al. (2008) haben Repressionsstudien an der LIM Kinase-1 (LIMK1) durchgeführt, deren Aktivität den Phosphorylierungsstatus von CFL1 beeinflusst. Sie konnten in HeLa-Zellen zeigen, dass diese beiden Interaktionspartner an der korrekten Spindel-Positionierung während der Mitose beteiligt sind. Diese und weitere Studien konnten u. a. auch für Zellen des Prostatakarzinoms zeigen, dass eine Inhibition der CFL1-Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivität des Proteins einen G2/M-Phasen-Arrest induziert und somit eine korrekte Zellteilung verhindert wird (Kaji et al. 2008, Davila et al. 2003, Davila et al. 2007). Den gleichen Effekt konnten Hsu et al. (2010) für ein weiteres Mitglied der LIMK Serin/Threonin Kinasen-Familie, LIMK2b, zeigen. Auch hier ergab eine gesteigerte CFL1-Aktivität in LNCaP-Zellen des Prostatakarzinoms einen Arrest in der G2-Phase.

Da die Beobachtungen von Kaji et al. (2008) sowie Hsu et al. (2010) den in Zellen des Pankreaskarzinoms nicht nachweisbaren G2-Arrest und die Ergebnisse von Tsai et al. (2009) sogar einen völlig gegensätzlichen Einfluss von CFL1 auf die Wachstumsregulation beschreiben, muss mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass die Funktion von CFL1 stark variieren kann und vom jeweiligen zellulären Kontext abhängig ist.

5.2.2 Cofilin ist auch im Pankreaskarzinom mit der Motilität von Tumorzellen verknüpft

Neben den Proliferationseffekten wurde auch der Einfluss der CFL1-Expression auf die Zellmigration überprüft. Die CFL1-Repression induzierte dabei sowohl in „Time Lapse“-Analysen als auch in Wundheilungsassays eine Verlangsamung der Zellbewegungen. Die direkte Form der Migration in „Boyden Chamber“-Assays blieb dagegen von der CFL1-Expression unbeeinflusst.

Für eine erfolgreiche Fortbewegung adherenter Zellen sind der schnelle Umbau und die Neubildung der Aktinfilamente am Leitsaum essentiell (Ono 2003, Yeoh et al. 2002). Cofilin-1 ist in der Lage, an Aktinfilamente zu binden und diese sowohl ab- als auch auszubauen. Eine Depolymerisation resultiert in einer Steigerung des globulären Aktins, welches anschließend im Leitsaum der Zellen für eine Entwicklung neuer Aktinfilamente zur Verfügung steht (Carlier & Pantaloni 1997, Maciver & Hussey 2002, Carlier & Pantaloni 1997). Aufgrund dieses Mechanismus sollte eine geringere CFL1-

Expression zu einer verlangsamten Aktin-Dynamik führen, die sich in einer verminderten Zellmigration niederschlägt, während hohe Expressionslevel die Motilität erhöhen.

Diese Hypothese bezüglich der migrationsregulierenden Funktion von Cofilin-1 konnte in verschiedenen Studien sowohl in Bezug auf die Keimesentwicklung als auch auf maligne Erkrankungen bestätigt werden und entspricht den hier vorgestellten Ergebnissen. Beispielsweise wurde beobachtet, dass eine Überexpression des Cofilin-Gens in Schleimpilzen (*Dictyostelium discoideum*) den F-Aktin-Anteil erhöhte, während die Konzentration an monomerem Aktin gleich blieb (Aizawa et al. 1996). Daraus resultierten in dieser Spezies vermehrte Aktinbündel in der Nähe des Leitsaums der Zellen, sowie gesteigerte Zellbewegungen.

Im umgekehrten Fall der Repression des Cofilin-Gens konnte dagegen gezeigt werden, dass die resultierende Inhibition der Zellmigration oft mit lethalen oder krankhaften Phänotypen verbunden ist. So ist eine generelle Cofilin-Defizienz in Mäusen (CFL1^{-/-}) im Embryonalstadium E9.5 lethal (Gurniak et al. 2005). Als Ursache hierfür beschrieben die Autoren, dass n-Cofilin von essentieller Bedeutung für die Migration der Zellen des Neuralwulstes ist. Eine Inaktivierung des Gens führte zu einer Störung der Neurulation, da durch die fehlende Motilität der Zellen ein Verschluss der Neuralplatte nicht gewährleistet war (Gurniak et al. 2005).

Um diese lethalen, embryonalen Phänotypen zu umgehen, wurden konditionale Knock-out-Mäuse generiert, mit deren Hilfe die Rolle der Aktin-Dynamik in der Hirnentwicklung analysiert werden sollte (Bellenchi et al. 2007). Es zeigte sich, dass diese Mutationen sowohl in Zellzyklus-Defekten resultierten, als auch die Migration neuronaler Zellen des zerebralen Kortexes beeinflussten.

Die zelluläre Migration und Invasion ist eine charakteristische Eigenschaft von Tumorzellen (Friedl & Gilmour 2009). Deshalb wurden Mutationen des Cofilin-Gens in den letzten Jahren neben einigen geistigen Erkrankungen wie Schizophrenie und Epilepsie auch mit malignen Transformationen verschiedenster Gewebe in Verbindung gebracht. Beispielsweise wurde der Einfluss von Cofilin-1 auf die Motilität von Glioblastom-Zellen anhand von Überexpressionsmodellen untersucht (Yap et al. 2005). Dabei resultierte eine 2- bis 4-fache Steigerung der Cofilin-Expression in einer zunehmenden Zellmigration, während eine noch stärkere Überexpression diese hemmt. Einen ähnlichen Einfluss der Cofilin-Expression konnten Dang und Kollegen (2006) für die Melanomzellen K1735 beschreiben. Hier zeigte sich, dass der

Cofilinstatus dieser Zellen deren Interaktion mit der extrazellulären Matrix beeinflusst, wodurch sich Effekte bezüglich Adhäsion, Migration und Invasion ergeben.

Auch in Modellsystemen des Mammakarzinoms wurde ein CFL1-induzierter Effekt auf die Zellmotilität entdeckt. Sowohl in metastasierenden Zellen der Ratte (Wang et al. 2007) als auch in invasiven Maus-Zellen (Wang et al. 2006) ergab sich eine Abhängigkeit des Migrationsverhalten von dem aktuellen Cofilin-1-Status. Zuletzt konnte der Zusammenhang zwischen Cofilin-1 und der zellulären Migration auf pulmonare Adenokarzinome übertragen werden (Peng et al. 2011). Diese Arbeitsgruppe untersuchte mittels Proteomanalysen Tumore der Lunge, um potentielle Targetgene für Diagnostik und Therapie aufzuspüren. Bei diesen Analysen erfolgte u. a. die Auswahl von Cofilin für potentielle Folgeexperimente. Deshalb wurde die Modellzelllinie des Lungenkarzinoms LL/2 mit einer shRNA gegen Cofilin-1 behandelt, wodurch in einem nachfolgenden Mausmodell die Metastasierung der Zellen inhibiert wurde, was letztendlich zu verlängerten Überlebensraten führte.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten bezüglich der zellulären Migration unterstützen die Ergebnisse dieser Studien. Wie oben bereits erwähnt, führte die Repression von Cofilin-1 in verschiedenen Zellen des Pankreaskarzinoms zu einer verminderten Zellbewegung sowohl in „Time Lapse“-Analysen als auch in Wundschluss-Assays. Lediglich die Ergebnisse der „Boyden Chamber“-Assays waren zunächst unstimmig. Allerdings analysieren die durchgeführten Assays unterschiedliche Arten der Migration. In der Literatur werden bezüglich der zellulären Migration zum einen der mesenchymale, zum anderen der amöboide Typ beschrieben (Friedl 2004). Mesenchymal migrierende Zellen sind durch eine langsame Fortbewegung gekennzeichnet, die in einer invadopoden-abhängigen Invasion in die extrazelluläre Matrix resultiert (Friedl & Wolf 2003). Die Geschwindigkeit dieses Migrationstyps kann durch „Time Lapse“-Analysen und Wundheilungsassays überprüft werden. „Boyden Chamber“-Assays analysieren dagegen verstärkt den amöboiden Typ der Bewegung, der dadurch charakterisiert ist, dass sich die Zellen eher ungerichtet durch bereits in der ECM vorhandene Lücken hindurchzwängen (Friedl & Wolf 2003).

Die hier vorgestellten Migrationsdaten lassen den Schluss zu, dass die Repression von Cofilin-1 die verschiedenen Arten der Zellmigration unterschiedlich stark beeinflusst. Die Resultate entsprechen den Beobachtungen einer anderen Arbeitsgruppe, die für eine Modell-Zelllinie des Mammakarzinoms der Ratte (MTLn3) die gleichen Resultate erzielten (Wang et al. 2006). Auch hier zeigte sich ein größerer Einfluss des CFL1-

Expressionsstatus auf mesenchymal migrierende Zellen. Somit liegen die fehlenden Effekte in den „Boyden Chamber“-Assays vermutlich darin begründet, dass die amöboide Fortbewegung der Zellen von der Cofilin-Expression unabhängiger ist. Welcher Mechanismus diesen Vorgängen genau zu Grunde liegen, konnte in der hier vorliegenden Arbeit allerdings nicht ermittelt werden und bedarf weiterer Analysen.

5.3 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Im Verlauf der hier vorgestellten Arbeit war es möglich, die Methode der reversen Transfektion zumindest für die Analyse von Überexpressionseffekten in unserem Labor zu etablieren. Am Beispiel von Cofilin-1 konnte gezeigt werden, dass die Identifikation von Kandidaten mit potentiell interessanten und bisher unbeschriebenen Funktionen mit diesem Verfahren potentiell möglich war. So konnten hier die Ergebnisse der parallelisierten Experimente in nachfolgenden Einzel-Charakterisierungen validiert werden. Allerdings handelt es sich bei diesem Resultat um ein einzelnes experimentelles Beispiel. Letztendlich reicht dies nicht aus, um eine generelle Aussage treffen zu können, ob die „Reverse Transfection“-Technologie für eine gesicherte Vorhersage potentiell interessanter Kandidatengene aus einem Kollektiv geeignet ist. Allerdings sind neben Cofilin-1 noch neun weitere Kandidatengene mit auffälligen funktionellen Effekten evaluiert worden, von denen zurzeit in unserem Labor einige, wie beispielsweise PLAC-8 oder FASTK, funktionell charakterisiert werden. Die Ergebnisse dieser Experimente können weitere Hinweise über die Verlässlichkeit der Methode liefern.

Im Gegensatz dazu wurde die Repressionsanalyse der Kandidatengene im parallelisierten Ansatz letztendlich nicht durchgeführt, da sich bereits in der Planungsphase dieses Projektteils verschiedene Schwierigkeiten und ein hoher Kostenaufwand ergaben. Aufgrund dessen wurde dieser Teil der Analyse nach den herkömmlichen Verfahren durchgeführt.

Im Zuge dieser Arbeit konnte die Rolle von Cofilin-1 zum ersten Mal für das Modellsystem des Pankreaskarzinoms charakterisiert werden. Der identifizierte wachstumsregulatorische Effekt dieses Gens ist bisher für diese Erkrankung unbeschrieben. Da verschiedene Analysen zeigten, dass CFL1 im Gewebe des duktales Adenokarzinoms im Vergleich zu gesundem Gewebe signifikant erhöht

vorliegt, kann von einer pro-onkogenen Rolle dieses Kandidaten ausgegangen werden. Der genaue Mechanismus, der hinter diesen Effekten steckt, konnte allerdings in dieser Arbeit nicht vollständig aufgeklärt werden. Zwar konnte anhand von durchflusszytometrischen Analysen verdeutlicht werden, dass der in der Literatur beschriebene Effekt der gestörten Zellteilung in der späten Telophase in Verbindung mit einer gehemmten Aktin-Dynamik im Pankreaskarzinom nicht gilt. Welche Regulationswege letztendlich aber die beobachtete Wachstumshemmung hervorrufen und welche Interaktionspartner möglicherweise an diesem Vorgang beteiligt sind, konnte noch nicht ermittelt werden und bedarf weiterer Analysen.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für die ermittelten Effekte in Bezug auf die zelluläre Migration. Hier konnten zwar in der Literatur beschriebene Einflüsse von Cofilin-1 im Modellsystem des Pankreaskarzinoms reproduziert werden, allerdings bleibt auch hier unklar, welche Regulationswege für die Inhibition der zellulären Motilität verwendet werden. Um einen tieferen Einblick in das CFL1-abhängige Invasionsverhalten der pankreatischen Zelllinien zu gewinnen, wurden neben den *in vitro*-Analysen für die hier vorliegende Arbeit bereits erste Xenograft-Experimente durchgeführt. Allerdings stellte sich heraus, dass das dafür ausgewählte, induzierbare Vektorsystem pTRIPZ ungeeignet war. Aufgrund dessen sind in der Arbeitsgruppe zurzeit Versuche mit einem zweiten shRNA-Expressionskonstrukt in Bearbeitung, die auf dem pLKO3-Vektor basieren, der freundlicherweise von dem NGFN-Kooperationspartner Dr. Stephan Hahn aus Bochum zur Verfügung gestellt wurde.

Letztendlich konnten die hier vorgestellten Daten belegen, dass Cofilin-1 eine interessante potentielle neue Ansatzstelle für eine verbesserte Therapie des Pankreaskarzinoms darstellt, da die Inhibition dieses Gens sowohl eine wachstumsregulatorische als auch motilitätshemmende Wirkung zur Folge hat.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abe H, Obinata T, Minamide LS, Bamburg JR. 1996. *Xenopus laevis* actin-depolymerizing factor/cofilin: a phosphorylation-regulated protein essential for development. *J. Cell Biol.* 132(5):871-85
2. Aizawa H, Sutoh K, Yahara I. 1996. Overexpression of cofilin stimulates bundling of actin filaments, membrane ruffling, and cell movement in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* 132(3):335-44
3. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. 1988. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 53(4):549-54
4. Andea A, Sarkar F, Adsay VN. 2003. Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod. Pathol.* 16(10):996-1006
5. Bamburg JR. 1999. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15:185-230
6. Bamburg JR, Bernstein BW. 2008. ADF/cofilin. *Curr. Biol.* 18(7):R273-R275
7. Bamburg JR, Bray D. 1987. Distribution and cellular localization of actin depolymerizing factor. *J. Cell Biol.* 105(6 Pt 1):2817-25
8. Bamburg JR, McGough A, Ono S. 1999. Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends Cell Biol.* 9(9):364-70
9. Bellenchi GC, Gurniak CB, Perlas E, Middei S, mmassari-Teule M, Witke W. 2007. N-cofilin is associated with neuronal migration disorders and cell cycle control in the cerebral cortex. *Genes Dev.* 21(18):2347-57
10. Bernstein BW, Bamburg JR. 2010. ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol.* 20(4):187-95
11. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.:248-54

12. Brugge WR, Lauwers GY, Sahani D, Fernandez-del CC, Warshaw AL. 2004. Cystic neoplasms of the pancreas. *N. Engl. J. Med.* 351(12):1218-26
13. Buchholz M, Kestler HA, Bauer A, Bock W, Rau B et al. 2005. Specialized DNA arrays for the differentiation of pancreatic tumors. *Clin. Cancer Res.* 11(22):8048-54
14. Burnette WN. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112(2):195-203
15. Burris HA, III, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML et al. 1997. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 15(6):2403-13
16. Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M et al. 1994. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat. Genet.* 8(1):27-32
17. Caldas C, Kern SE. 1995. K-ras mutation and pancreatic adenocarcinoma. *Int. J. Pancreatol.* 18(1):1-6
18. Cao LG, Wang YL. 1990. Mechanism of the formation of contractile ring in dividing cultured animal cells. II. Cortical movement of microinjected actin filaments. *J. Cell Biol.* 111(5 Pt 1):1905-11
19. Carlier MF, Pantaloni D. 1997. Control of actin dynamics in cell motility. *J. Mol. Biol.* 269(4):459-67
20. Carlier MF, Ressay F, Pantaloni D. 1999. Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/cofilin. *J. Biol. Chem.* 274(48):33827-30
21. Cascinu S, Falconi M, Valentini V, Jelic S. 2010. Pancreatic cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 21 Suppl 5:v55-v58
22. Chhabra ES, Higgs HN. 2007. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat. Cell Biol.* 9(10):1110-21

23. Chu GC, Kimmelman AC, Hezel AF, DePinho RA. 2007. Stromal biology of pancreatic cancer. *J. Cell Biochem.* 101(4):887-907
24. Conrad C, Erfle H, Warnat P, Daigle N, Lorch T et al. 2004. Automatic identification of subcellular phenotypes on human cell arrays. *Genome Res.* 14(6):1130-6
25. Crnogorac-Jurcevic T, Efthimiou E, Capelli P, Blaveri E, Baron A et al. 2001. Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia. *Oncogene.* 20(50):7437-46
26. Dang D, Bamburg JR, Ramos DM. 2006. Alpha5beta3 integrin and cofilin modulate K1735 melanoma cell invasion. *Exp. Cell Res.* 312(4):468-77
27. Davila M, Frost AR, Grizzle WE, Chakrabarti R. 2003. LIM kinase 1 is essential for the invasive growth of prostate epithelial cells: implications in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* 278(38):36868-75
28. Davila M, Jhala D, Ghosh D, Grizzle WE, Chakrabarti R. 2007. Expression of LIM kinase 1 is associated with reversible G1/S phase arrest, chromosomal instability and prostate cancer. *Mol. Cancer.* 6:40:40
29. dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M et al. 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* 83(2):433-73
30. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. 1999. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat. Genet.* 21(1 Suppl):10-4
31. Erkan M, Michalski CW, Rieder S, Reiser-Erkan C, Abiatari I et al. 2008. The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 6(10):1155-61
32. Fensterer H, Giehl K, Buchholz M, Ellenrieder V, Buck A et al. 2004. Expression profiling of the influence of RAS mutants on the TGFB1-induced phenotype of the pancreatic cancer cell line PANC-1. *Genes Chromosomes. Cancer* 39(3):224-35
33. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* 127(12):2893-917

34. Friedl P. 2004. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16(1):14-23
35. Friedl P, Gilmour D. 2009. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10(7):445-57
36. Friedl P, Wolf K. 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 3(5):362-74
37. Geng MM, Ellenrieder V, Wallrapp C, Muller-Pillasch F, Sommer G et al. 1999. Use of representational difference analysis to study the effect of TGFB on the expression profile of a pancreatic cancer cell line. *Genes Chromosomes. Cancer.* 26(1):70-9
38. Glotzer M. 2005. The molecular requirements for cytokinesis. *Science.* 307(5716):1735-9
39. Goggins M, Shekher M, Turnacioglu K, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. 1998. Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res.* 58(23):5329-32
40. Gress TM, Muller-Pillasch F, Geng M, Zimmerhackl F, Zehetner G et al. 1996. A pancreatic cancer-specific expression profile. *Oncogene* 13(8):1819-30
41. Gress TM, Wallrapp C, Frohme M, Muller-Pillasch F, Lacher U et al. 1997. Identification of genes with specific expression in pancreatic cancer by cDNA representational difference analysis. *Genes Chromosomes. Cancer.* 19(2):97-103
42. Gunsalus KC, Bonaccorsi S, Williams E, Verni F, Gatti M, Goldberg ML. 1995. Mutations in twinstar, a Drosophila gene encoding a cofilin/ADF homologue, result in defects in centrosome migration and cytokinesis. *J. Cell Biol.* 131(5):1243-59
43. Gurniak CB, Perlas E, Witke W. 2005. The actin depolymerizing factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration. *Dev. Biol.* 278(1):231-41
44. Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT et al. 1996. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271(5247):350-3

45. Han H, Bearss DJ, Browne LW, Calaluca R, Nagle RB, Von Hoff DD. 2002. Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray. *Cancer Res.* 62(10):2890-6
46. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, DePinho RA. 2006. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 20(10):1218-49
47. Hidalgo M. 2010. Pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 362(17):1605-17
48. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. 2000. Progression model for pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 6(8):2969-72
49. Hruban RH, Maitra A, Goggins M. 2008. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 1(4):306-16
50. Hruban RH, Maitra A, Kern SE, Goggins M. 2007. Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 36(4):831-49, vi
51. Hsu FF, Lin TY, Chen JY, Shieh SY. 2010. p53-Mediated transactivation of LIMK2b links actin dynamics to cell cycle checkpoint control. *Oncogene.* 29(19):2864-76
52. Hustinx SR, Leoni LM, Yeo CJ, Brown PN, Goggins M et al. 2005. Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Mod. Pathol.* 18(7):959-63
53. Huth J, Buchholz M, Kraus JM, Molhave K, Gradinaru C et al. 2011. TimeLapseAnalyzer: multi-target analysis for live-cell imaging and time-lapse microscopy. *Comput. Methods Programs Biomed.* 104(2):227-34
54. Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Maitra A, Adsay NV, Shen-Ong GL et al. 2003. Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies. *Cancer Res.* 63(24):8614-22
55. Iida K, Moriyama K, Matsumoto S, Kawasaki H, Nishida E, Yahara I. 1993. Isolation of a yeast essential gene, COF1, that encodes a homologue of mammalian cofilin, a low-M(r) actin-binding and depolymerizing protein. *Gene.* 124(1):115-20

56. Iwamura T, Katsuki T, Ide K. 1987. Establishment and characterization of a human pancreatic cancer cell line (SUIT-2) producing carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9. *Jpn. J. Cancer Res.* 78(1):54-62
57. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 61(2):69-90
58. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. 2007. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J. Clin.* 57(1):43-66
59. Kaji N, Muramoto A, Mizuno K. 2008. LIM kinase-mediated cofilin phosphorylation during mitosis is required for precise spindle positioning. *J. Biol. Chem.* 283(8):4983-92
60. Kumar R, Conklin DS, Mittal V. 2003. High-throughput selection of effective RNAi probes for gene silencing. *Genome Res.* 13(10):2333-40
61. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 409(6822):860-921
62. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. 2004. Pancreatic cancer. *Lancet* 363(9414):1049-57
63. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. 1975. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int. J. Cancer* 15(5):741-7
64. Liggett WH, Jr., Sidransky D. 1998. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J. Clin. Oncol.* 16(3):1197-206
65. Logsdon CD, Simeone DM, Binkley C, Arumugam T, Greenson JK et al. 2003. Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 63(10):2649-57
66. Loos M, Kleeff J, Friess H, Buchler MW. 2008. Surgical treatment of pancreatic cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1138:169-80
67. Lu Z, Hu L, Evers S, Chen J, Shen Y. 2004. Differential expression profiling of human pancreatic adenocarcinoma and healthy pancreatic tissue. *Proteomics.* 4(12):3975-88

68. Maciver SK, Hussey PJ. 2002. The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biol.* 3(5):reviews3007
69. Maekawa S, Nishida E, Ohta Y, Sakai H. 1984. Isolation of low molecular weight actin-binding proteins from porcine brain. *J. Biochem.* 95(2):377-85
70. Mahadevan D, Von Hoff DD. 2007. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol. Cancer Ther.* 6(4):1186-97
71. Maitra A, Fukushima N, Takaori K, Hruban RH. 2005. Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv. Anat. Pathol.* 12(2):81-91
72. Maitra A, Hruban RH. 2008. Pancreatic cancer. *Annu. Rev. Pathol.* 3:157-88
73. Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I et al. 2002. Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut.* 51(6):849-52
74. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La VC, Negri E. 2012. European cancer mortality predictions for the year 2012. *Ann. Oncol.* 23(4):1044-52
75. Mannherz O, Mertens D, Hahn M, Lichter P. 2006. Functional screening for proapoptotic genes by reverse transfection cell array technology. *Genomics* 87(5):665-72
76. McKim KS, Matheson C, Marra MA, Wakarchuk MF, Baillie DL. 1994. The *Caenorhabditis elegans* unc-60 gene encodes proteins homologous to a family of actin-binding proteins. *Mol. Gen. Genet.* 242(3):346-57
77. Mogilner A, Edelstein-Keshet L. 2002. Regulation of actin dynamics in rapidly moving cells: a quantitative analysis. *Biophys. J.* 83(3):1237-58
78. Moon AL, Janmey PA, Louie KA, Drubin DG. 1993. Cofilin is an essential component of the yeast cortical cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 120(2):421-35
79. Moskaluk CA, Hruban RH, Kern SE. 1997. p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 57(11):2140-3
80. Nagaoka R, Abe H, Kusano K, Obinata T. 1995. Concentration of cofilin, a small actin-binding protein, at the cleavage furrow during cytokinesis. *Cell Motil. Cytoskeleton* 30(1):1-7

81. Nakashima K, Sato N, Nakagaki T, Abe H, Ono S, Obinata T. 2005. Two mouse cofilin isoforms, muscle-type (MCF) and non-muscle type (NMCF), interact with F-actin with different efficiencies. *J. Biochem.* 138(4):519-26
82. Neesse A, Michl P, Frese KK, Feig C, Cook N et al. 2011. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut* 60(6):861-8
83. Nishida E, Iida K, Yonezawa N, Koyasu S, Yahara I, Sakai H. 1987. Cofilin is a component of intranuclear and cytoplasmic actin rods induced in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84(15):5262-6
84. Nishida E, Maekawa S, Muneyuki E, Sakai H. 1984a. Action of a 19K protein from porcine brain on actin polymerization: a new functional class of actin-binding proteins. *J. Biochem.* 95(2):387-98
85. Nishida E, Maekawa S, Sakai H. 1984b. Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. *Biochemistry.* 23(22):5307-13
86. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D et al. 2009. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 324(5933):1457-61
87. Ono S. 2003. Regulation of actin filament dynamics by actin depolymerizing factor/cofilin and actin-interacting protein 1: new blades for twisted filaments. *Biochemistry* 42(46):13363-70
88. Ono S, Minami N, Abe H, Obinata T. 1994. Characterization of a novel cofilin isoform that is predominantly expressed in mammalian skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 269(21):15280-6
89. Ozawa F, Friess H, Tempia-Caliera A, Kleeff J, Buchler MW. 2001. Growth factors and their receptors in pancreatic cancer. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 21(1):27-44
90. Pavlov D, Muhlrad A, Cooper J, Wear M, Reisler E. 2007. Actin filament severing by cofilin. *J. Mol. Biol.* 365(5):1350-8
91. Peng XC, Gong FM, Zhao YW, Zhou LX, Xie YW et al. 2011. Comparative proteomic approach identifies PKM2 and cofilin-1 as potential diagnostic, prognostic and therapeutic targets for pulmonary adenocarcinoma. *PLoS. One.* 6(11):e27309

92. Pollard TD. 2007. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36:451-77.:451-77
93. Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29:545-76.:545-76
94. Pollard TD, Borisy GG. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 112(4):453-65
95. Redston MS, Caldas C, Seymour AB, Hruban RH, da CL et al. 1994. p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res.* 54(11):3025-33
96. Sakorafas GH, Tsiotou AG, Tsiotos GG. 2000. Molecular biology of pancreatic cancer; oncogenes, tumour suppressor genes, growth factors, and their receptors from a clinical perspective. *Cancer Treat. Rev.* 26(1):29-52
97. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 270(5235):467-70
98. Schutte M, Hruban RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W et al. 1997. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res.* 57(15):3126-30
99. Seufferlein T, Bachet JB, Van Cutsem E, Rougier P, on behalf of the ESMO Guidelines Working Group. 2012. Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 23(suppl 7):vii33-vii40
100. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. 2012. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* 62(1):10-29
101. Silva JM, Mizuno H, Brady A, Lucito R, Hannon GJ. 2004. RNA interference microarrays: high-throughput loss-of-function genetics in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(17):6548-52
102. Simpson JC, Wellenreuther R, Poustka A, Pepperkok R, Wiemann S. 2000. Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. *EMBO Rep.* 1(3):287-92

103. Sipos B, Frank S, Gress T, Hahn S, Kloppel G. 2009. Pancreatic intraepithelial neoplasia revisited and updated. *Pancreatology*. 9(1-2):45-54
104. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76(9):4350-4
105. Tsai CH, Chiu SJ, Liu CC, Sheu TJ, Hsieh CH et al. 2009. Regulated expression of cofilin and the consequent regulation of p27(kip1) are essential for G(1) phase progression. *Cell Cycle* 8(15):2365-74
106. Tuveson DA, Shaw AT, Willis NA, Silver DP, Jackson EL et al. 2004. Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell* 5(4):375-87
107. van Troys M, Huyck L, Leyman S, Dhaese S, Vandekerckhove J, Ampe C. 2008. Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur. J. Cell Biol.* 87(8-9):649-67
108. Vartiainen MK, Mustonen T, Mattila PK, Ojala PJ, Thesleff I et al. 2002. The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics. *Mol. Biol. Cell.* 13(1):183-94
109. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science*. 291(5507):1304-51
110. Vila MR, Lloreta J, Schussler MH, Berrozpe G, Welt S, Real FX. 1995. New pancreas cancers cell lines that represent distinct stages of ductal differentiation. *Lab Invest* 72(4):395-404
111. Wang W, Mouneimne G, Sidani M, Wyckoff J, Chen X et al. 2006. The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors. *J. Cell Biol.* 173(3):395-404
112. Wang W, Wyckoff JB, Goswami S, Wang Y, Sidani M et al. 2007. Coordinated regulation of pathways for enhanced cell motility and chemotaxis is conserved in rat and mouse mammary tumors. *Cancer Res.* 67(8):3505-11
113. Webb BL, Diaz B, Martin GS, Lai F. 2003. A reporter system for reverse transfection cell arrays. *J. Biomol. Screen.* 8(6):620-3

114. Yap CT, Simpson TI, Pratt T, Price DJ, Maciver SK. 2005. The motility of glioblastoma tumour cells is modulated by intracellular cofilin expression in a concentration-dependent manner. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 60(3):153-65
115. Yeoh S, Pope B, Mannherz HG, Weeds A. 2002. Determining the differences in actin binding by human ADF and cofilin. *J. Mol. Biol.* 315(4):911-25
116. Yonezawa N, Nishida E, Koyasu S, Maekawa S, Ohta Y et al. 1987. Distribution among tissues and intracellular localization of cofilin, a 21kDa actin-binding protein. *Cell Struct. Funct.* 12(5):443-52
117. Ziauddin J, Sabatini DM. 2001. Microarrays of cells expressing defined cDNAs. *Nature* 411(6833):107-10
118. zur Hausen H. 1967. Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *J. Virol.* 1(6):1174-85

7 ANHANG

7.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Tabelle 39: Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Name |
|-----------------|---|
| °C | Grad Celsius |
| % | Prozent |
| A | Adenin |
| AB | Antibiotikum |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATCC | engl. American Type Culture Collection |
| Bp | Basenpaare |
| BP | Blottingpuffer |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin |
| CFL1 | Cofilin-1 |
| CFP | engl. Cyan fluorescing protein; blau-fluoreszierendes Protein |
| cm | Zentimeter |
| cm ² | Quadrat-Zentimeter |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CP | Cytoplasma |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid |
| DMEM | engl. Dulbecco's modified eagle medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | engl. Desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxy-Nucleotidtriphosphate |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| et al. | lat. Et alii; und andere |
| FBS | engl. Fetal bovine serum; fötales Kälberserum |
| G | Guanin |

Fortsetzung Tabelle 39: Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Name |
|-----------------|--|
| GFP | engl. Green fluorescing protein; grün-fluoreszierendes Protein |
| GmbH | Gesellschaft mit beschränkter Haftung |
| h | Stunde |
| i.d.R. | in der Regel |
| Kap. | Kapitel |
| kB | Kilobasen |
| µl | Mikroliter |
| µg | Mikrogramm |
| µM | Mikromolar |
| M | Molar |
| max. | maximal |
| Mem | Membran |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mm ² | Quadrat-Millimeter |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| n | Anzahl |
| NaCl | Natriumchlorid |
| nm | Nanometer |
| NUC | Nukleus |
| ORF | engl. open reading frame; Offener Leserahmen |
| Orgs | Organellen |
| P | Wahrscheinlichkeit |
| PBS | engl. phosphate buffered saline; phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | engl. polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion |
| PDAC | engl. pancreatic ductal adenocarcinoma; duktales, pankreatisches Adenokarzinom |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pH | potential hydrogenii; pH-Wert |
| qRT-PCR | engl. quantitative Real-Time-PCR; quantitative Echtzeit-PCR |

Fortsetzung Tabelle 39: Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Name |
|-----------|---|
| ® | registrierte Marke |
| rlu | engl. relative lights unit |
| RNA | engl. ribonucleic acid; Ribonukleinsäure |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| rpm | engl. rounds per minute; Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| s. | siehe |
| S. | Seite |
| SD | engl. standard ; Standardabweichung |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| siRNA | engl. small interfering RNA |
| T | Thymin |
| T | Temperatur |
| ™ | Trademark |
| TMA | engl. tumour microarrays |
| U | Uracil |
| UK | United Kingdom |
| USA | United States of America |
| vgl. | vergleiche |
| v/v | engl. volume to volume |
| YFP | engl. yellow fluorescing protein; gelb-fluoreszierendes Protein |

7.2 PARALLELISIERTE CHARAKTERISIERUNG

7.2.1 Liste der verwendeten Überexpressionskonstrukte und siRNA-Pools und deren Sequenzen

Tabelle 40: Auflistung der 79 Kandidatengene und ihrer Sequenzen

| Status | Gene Symbol | Name | Gene ID (RefSeq) |
|------------------------------------|---------------|--|------------------|
| überexprimiert im Pankreaskarzinom | ADRBK1 | adrenergic, beta, receptor kinase 1 | NM_001619 |
| | AMF/GPI | glucose phosphate isomerase | NM_000175 |
| | AMFR | autocrine motility factor receptor | NM_001144 |
| | Amplaxin/CTTN | cortactin | NM_005231 |
| | ANXA2 | Lipocortin 2, ANXA2, annexin A2 | NM_004039 |
| | BAX | BCL2-associated X protein | NM_004324.3 |
| | CCL14 | chemokine (C-C motif) ligand 14 | NM_004166 |
| | CFL1 | cofilin 1 (non-muscle) | NM_005507 |
| | CLDN7 | Claudin 7 | NM_001307 |
| | CNK/CNKSR1 | connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1 | NM_006314 |
| | CNR2 | cannabinoid receptor 2 (macrophage) | NM_001841 |
| | COPEB/KLF6 | Kruppel-like factor 6 | NM_001300 |
| | CPNE1 | copine I | NM_003915 |
| | CRABP1 | cellular retinoic acid binding protein 1 | NM_004378 |
| | CTSE | Cathepsin E | NM_001910 |
| | DDR1 | discoidin domain receptor family, member 1 | NM_001954 |
| | EDNRA | endothelin receptor type A | NM_001957 |
| | ELF3 | E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial) | NM_004433 |
| | FASTK | Fas-activated serine/threonine kinase | NM_006712 |
| | G2AN/GANAB | glucosidase, alpha; neutral AB | NM_198334 |
| | GSPT1 | G1 to S phase transition 1 | NM_002094 |
| | H1FO | H1 histone family, member 0 | NM_005318 |
| | LGALS3 | lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3) | NM_002306 |
| | MAP3K11 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11 | NM_002419 |
| | MARVELD1 | MARVEL domain containing 1 | NM_031484 |
| | NFATC1 | nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 | NM_006162 |
| | NKX2-5 | NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila) | NM_004387 |
| | PCTK1 | PCTAIRE protein kinase 1 | NM_033018 |
| | PPM1G | protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent | NM_002707 |
| | PPP2R1A | protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), alpha isoform | NM_014225 |
| | PPP2R4 | protein phosphatase 2A, regulatory subunit B' (PR 53) | NM_021131 |
| | PROC | protein C (inactivator of coagulation factors Va and VIIIa) | NM_000312 |
| | PRSS25/HTRA2 | HtrA serine peptidase 2 | NM_013247 |
| | SDC1 | syndecan 1 | NM_002997 |
| | SPINT2 | serine peptidase inhibitor, Kunitz type, 2 | NM_021102 |
| | TAPBP | TAP binding protein (tapasin) | NM_003190 |
| | TM4SF1 | transmembrane 4 L six family member 1 | NM_014220 |
| | UNC84B | unc-84 homolog B (C. elegans) | NM_015374 |
| | UNG | uracil-DNA glycosylase | NM_003362 |

Fortsetzung Tabelle 40: Auflistung der 79 Kandidatengene und ihrer Sequenzen

| Status | Gene Symbol | Name | Gene ID (RefSeq) |
|---|-----------------|---|------------------|
| unterexprimiert im Pankreaskarzinom | ATF3 | activating transcription factor 3 | NM_001674 |
| | BCKD/BCKDK | branched chain ketoacid dehydrogenase kinase | NM_005881 |
| | CCL2 | chemokine (C-C motif) ligand 2 | NM_002982 |
| | DUSP1 | dual specificity phosphatase 1 | NM_004417 |
| | EBI2 | Epstein-Barr virus induced gene 2 (lymphocyte-specific G protein-coupled receptor) | NM_004951 |
| | EDG6 | endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 6 | NM_003775 |
| | FRA-2, FOSL2 | FOS-like antigen 2 | NM_005253 |
| | GTF2F2 | general transcription factor IIF, polypeptide 2, 30kDa | NM_004128 |
| | PTPN2 | protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2 | NM_002828 |
| | STK12/AURKB | aurora kinase B | NM_004217 |
| | ZNF22 | zinc finger protein 22 (KOX 15) | NM_006963 |
| spezifisch exprimiert in PanIN-Läsionen | AGR2 | anterior gradient 2 homolog (Xenopus laevis) | NM_006408 |
| | C8orf20/REEP4 | receptor accessory protein 4 | NM_025232 |
| | CDC37 | CDC37 cell division cycle 37 homolog (S. cerevisiae) | NM_007065 |
| | CST3 | cystatin C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage) | NM_000099 |
| | CYP4F12 | cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 12 | NM_023944 |
| | FOXA3 | forkhead box A3 | NM_004497 |
| | IFI27 | interferon, alpha-inducible protein 27 | NM_005532 |
| | IL13RA1 | interleukin 13 receptor, alpha 1 | NM_001560 |
| | LGALS4 | lectin, galactoside-binding, soluble, 4 (galectin 4) | NM_006149 |
| | PLAC8 | placenta-specific 8 | NM_016619 |
| | POLR3K | polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K, 12.3 kDa | NM_016310 |
| | RAB34 | RAB34, member RAS oncogene family | NM_031934 |
| | RABAC1 | Rab acceptor 1 (prenylated) | NM_006423 |
| | S100P | S100 calcium binding protein P | NM_005980 |
| | SQLE | squalene epoxidase | NM_003129 |
| Kontrollgene mit bekannter Funktion | TFF1 | trefoil factor 1 | NM_003225 |
| | BCL-10 | B-cell CLL/lymphoma 10 | NM_003921 |
| | BIRC5 | baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin) | NM_001168 |
| | CCND1 | CyclinD1 | NM_053056 |
| | CLDN4 | Claudin 4 | NM_001305 |
| | KCMF1 | potassium channel modulatory factor 1 | NM_020122 |
| | MMP2 | matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase) | NM_004530 |
| | PAI-1/ SERPINE1 | serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 | NM_000602 |
| | Rab20 | RAB20, member RAS oncogene family | NM_017817 |
| | Smac/DIABLO | diablo homolog (Drosophila) | NM_019887 |
| | TGFB1 (c.a.) | transforming growth factor, beta receptor I (constitutive active) | mutant |
| | TGFB2 (d.n.) | transforming growth factor, beta receptor II (dominant negative) | mutant |
| | TIMP2 | TIMP metalloproteinase inhibitor 2 | NM_003255 |
| | XIAP/BIRC4 | baculoviral IAP repeat-containing 4 | NM_001167 |

Tabelle 41: Auflistung der 12 PaCaNet-Gene und ihrer Sequenzen

| Status | Gene Symbol | Name | Gene ID (RefSeq) |
|---|-------------|---|------------------|
| PaCaNet-Gen: überexprimiert im Pankreaskarzinom | CDC20 | cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae) | NM_001255.2 |
| | MAPRE2 | microtubuli-associated protein, RP/EB family, member 2 | NM_001143826.1 |
| | PKM2 | pyruvate kinase, muscle 2 | NM_001206796.1 |
| | TSG101 | tumor susceptibility gene 101 | NM_006292.3 |
| | NT5E | 5'-nucleotidase, ecto (CD73) | NM_001204813.1 |
| | EZH2 | enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila) | NM_001203247.1 |
| | MRE11A | MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae) | NM_005590.3 |
| | SUV39H1 | suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila) | NM_003173.2 |
| | RALB | v-ral simian leukemia viral oncogene homolog B (ras related; GTP binding protein) | NM_002881.2 |
| | SRPK1 | SRSF protein kinase 1 | NM_003137.4 |
| | PRKCZ | protein kinase C, zeta | NM_001033581.1 |
| | RRAS | related RAS viral (r-ras) oncogene homolog | NM_006270.3 |

Tabelle 42: Auflistung der 106 siRNA-Pools und ihre Sequenzen

| Status | Gene Symbol | Gene ID (RefSeq) | # siRNA | Sequenz |
|--------|-------------|------------------|---------|----------------------|
| ÜE | ADRBK1 | NM_001619 | 1 | GCAGUGUCAUGCAGAAGUA |
| | | | 2 | GCUGGAGGCUCGCAAGAAA |
| | | | 3 | GCAAGUGCCUGCUCCUCAA |
| | | | 4 | CAGCGUGCAUCGCAUCAUU |
| ÜE | GPI | NM_000175 | 1 | GGAAAUACAUCACCAAUC |
| | | | 2 | CAACCAAAGUGAAGGAGUU |
| | | | 3 | GAUGAUACCCUGUGACUUC |
| | | | 4 | UCACGACGCUUCUACCAU |
| ÜE | AMFR | NM_001144 | 1 | GCAAGGAUCGAUUUGAAUA |
| | | | 2 | GGAGCUGGCUGUCAACAAU |
| | | | 3 | GAGGACUGCUC AUGUGAUU |
| | | | 4 | CGAGCUGGCUGCCGAGUUU |
| ÜE | CTTN | NM_005231 | 1 | GAACAAGACCGAAUGGAUA |
| | | | 2 | GAAUAUCAGUCGAAACUUU |
| | | | 3 | GGACAGAGUUGAUCAGUCU |
| | | | 4 | ACAGAGAGAUUACUCCAAA |
| ÜE | ANXA2 | NM_004039 | 1 | AGACCAAAGGUGUGGAUGA |
| | | | 2 | CUGUCAAGCCUAUACUAA |
| | | | 3 | CGACGAGGACUCUCUCAUU |
| | | | 4 | AUACUAACUUUGAUGCUGA |
| ÜE | CCL14 | NM_004166 | 1 | ACAAGUGGGUCCAGGACUA |
| | | | 2 | UGGAUUACUAUGAGACCAA |
| | | | 3 | CCUACAAGAUCCCCGCGUCA |
| | | | 4 | CGUCAGCGGAUUUUGGAUU |
| ÜE | CFL1 | NM_005507 | 1 | UGACAGGGAUCAAGCAUGA |
| | | | 2 | GCGGUGCUCUUCUGCCUGA |
| | | | 3 | GUCAAGAUGCUGCCAGAU |
| | | | 4 | GCUAUGCCCUCUAUGAUGC |
| ÜE | CLDN7 | NM_001307 | 1 | UCCCUGCACUCCAUGUAUA |
| | | | 2 | GCCAUCAGAUUGUCACAGA |
| | | | 3 | GUAGCUUGCUCUGGUAUG |
| | | | 4 | UUUGAUCCCUACCAACAUU |

Fortsetzung Tabelle 42: Auflistung der 106 siRNA-Pools und ihre Sequenzen

| Status | Gene Symbol | Gene ID (RefSeq) | # siRNA | Sequenz |
|--------|-------------|------------------|---------|----------------------|
| ÜE | CNKSR1 | NM_006314 | 1 | GACACACGCUCUACUGGUA |
| | | | 2 | GAGACGAGGUUGUCCAGAU |
| | | | 3 | UGACAGAUCUGAGCAUGUG |
| | | | 4 | GGAGAGAAGUCCGCCAGU |
| ÜE | CNR2 | NM_001841 | 1 | GAACGUGGCUGUGCUCUAU |
| | | | 2 | GGAUCAUCUACACCUAUG |
| | | | 3 | GCAUGCAGCUUUGUGAAUU |
| | | | 4 | CCAACCCUAUGAAGGAUUA |
| ÜE | COPEB | NM_001300 | 1 | GCCUAGAGCUGGAACGUUA |
| | | | 2 | GCAGGAAAGUUUACACCAA |
| | | | 3 | UGCAAGAAGUGAUGAGUUA |
| | | | 4 | AAAUUGAGCUCCUCUGUCA |
| ÜE | CPNE1 | NM_003915 | 1 | GAUCUGAGGUCAUCAAGAA |
| | | | 2 | GGUCUCAGCUCAGGAUUUA |
| | | | 3 | CCAGAAACCUAGAUAAAGAA |
| | | | 4 | GGACAAUCGUGUAGUAACC |
| ÜE | CRABP1 | NM_004378 | 1 | GAUCAGUUCUACAUAAGA |
| | | | 2 | GAAUUUAUGUCCGGGAUG |
| | | | 3 | GGCCAACGAUGAACUUUUC |
| | | | 4 | GCAGGAGUUUAGCCACUUG |
| ÜE | CTSE | NM_001910 | 1 | CAAGCUUACUGGCAGAUUG |
| | | | 2 | GAGCUUGUCCGGGAUCAUU |
| | | | 3 | CCAAGUCUCUGUGGAAGGA |
| | | | 4 | GAAUAACCGUGUGGGACUG |
| ÜE | DDR1 | NM_013994 | 1 | UGAAAGAGGUGAAGAUAU |
| | | | 2 | GGGACACCCUUUGCUGGUA |
| | | | 3 | GAAUGUCGCUUCCGGCGUG |
| | | | 4 | UGGUUACUCUUCAGCGAAA |
| ÜE | EDNRA | NM_001957 | 1 | GAACCGAUGUGAAUUAUUA |
| | | | 2 | GAAACCAGAAGGAUUAUUUA |
| | | | 3 | GAACUGACCACCCUUAGAA |
| | | | 4 | UCACAAUGACUUUGGCGUA |
| ÜE | ELF3 | NM_004433 | 1 | GAGCUCAGUUGGAUCAUUG |
| | | | 2 | GAAAGCUGAGCAAAGAGUA |
| | | | 3 | GAACAAGUACGACGCAAGC |
| | | | 4 | GGACCAAACUCACGGACCA |
| ÜE | FASTK | NM_006712 | 1 | GCAAGGUGGUACAGAAGUU |
| | | | 2 | GUUGGAAGCUGCUCUAAGC |
| | | | 3 | CUUCAGAGCCCUGCACUUU |
| | | | 4 | AAACGCAACUCAGCAGCAA |
| ÜE | GANAB | NM_198334 | 1 | GAAGAUCUCUAUUCUAUG |
| | | | 2 | CAUAUCGCCUCUACAAUUU |
| | | | 3 | GAUAGAAGCAACUUUAAGA |
| | | | 4 | GGGCUAACAUUUUCAGCUA |
| ÜE | GSPT1 | NM_002094 | 1 | UGUAGAGACUGAUACCGUA |
| | | | 2 | GGAUUACCGUUUAUUCCAU |
| | | | 3 | GAGGAAAUCCCAAACCUA |
| | | | 4 | CUCAAAGAGCAGUCGGAUU |
| ÜE | H1FO | NM_005318 | 1 | CCAAGACUGUCAAGCCAA |
| | | | 2 | UGUUACUUGUGCCGGGAAA |
| | | | 3 | AGAAGGUAGCCACGCCAAA |
| | | | 4 | UCGAUUUGGAUUUGCUAA |

Fortsetzung Tabelle 42: Auflistung der 106 siRNA-Pools und ihre Sequenzen

| Status | Gene Symbol | Gene ID (RefSeq) | # siRNA | Sequenz |
|--------|-------------|------------------|---------|----------------------|
| ÜE | LGALS3 | NM_002306 | 1 | GAAGAAAGACAGUCGGUUU |
| | | | 2 | GCAAUACAAAGCUGGAUAA |
| | | | 3 | GUACAAUCAUCGGGUUAAA |
| | | | 4 | CAGUACAAUCAUCGGGUUA |
| ÜE | MAP3K11 | NM_002419 | 1 | GCAUGCCACUCGACUUCAA |
| | | | 2 | CUGGAGGACUCAAGCAAUG |
| | | | 3 | GAAGCCAGAAGCCAAAUAA |
| | | | 4 | ACACUACACUGCACAGGAA |
| ÜE | NFATC1 | NM_172390 | 1 | UCAGAAACUCCGACAUUGA |
| | | | 2 | GGACAGCUAUCCGGUCGUG |
| | | | 3 | GUUGAGAUCCTCGCAUUUC |
| | | | 4 | AGGAAGAACACACGGGUAC |
| ÜE | NKX2-5 | NM_004387 | 1 | ACAACAACUUCGUGAACUU |
| | | | 2 | CCUCAAUCCUACGGUUUAU |
| | | | 3 | CCGGGAUUCGCGAGAGCAA |
| | | | 4 | GCUACAAGUGCAAGCGGCA |
| ÜE | PCTK1 | NM_006201 | 1 | UGACACUACUCCAUUUUU |
| | | | 2 | UCACCAAGCUGUUGCAGUU |
| | | | 3 | UAAAGGAGAUUCAGCUACA |
| | | | 4 | CAUGAAACAUCCAUUCUUC |
| ÜE | PPM1G | NM_002707 | 1 | GAACUAGCACGCAUCAAGA |
| | | | 2 | GGAGGAAGUUGCCUUGUAC |
| | | | 3 | GAGGGAAGCAGUUGAUUGU |
| | | | 4 | GCUAUUGACGCCAAAUUGA |
| ÜE | PPP2R1A | NM_014225 | 1 | UAGACGAACUCCGCAAUGA |
| | | | 2 | AGGCGGAACUUCGACAGUA |
| | | | 3 | UCAAGGAGCUGGUGUCCGA |
| | | | 4 | UCAUAGACGAACUCCGCAA |
| ÜE | PPP2R4 | NM_178003 | 1 | GAUGAAGACUGGCCCAUUU |
| | | | 2 | GAGUGUAUCCUGUUUAUUA |
| | | | 3 | CCACACAGUUCAGACAUG |
| | | | 4 | GCGCAUUGACUACGGCACA |
| ÜE | PROC | NM_000312 | 1 | GAAGCGCAGUCACCGAAA |
| | | | 2 | GCAGUGAAGUUCUUUGUG |
| | | | 3 | GCAGCGAGGUCAUGAGCAA |
| | | | 4 | GCAUAGAGGAGAUUCUGUGA |
| ÜE | PRSS25 | NM_145074 | 1 | GAGCAUGCCUGACGUCUGG |
| | | | 2 | GAAGAAUCCUCCUCCGGA |
| | | | 3 | AGUACACUUAUCGCAGA |
| | | | 4 | GCUAAGCGGCGACACGUAU |
| ÜE | SDC1 | NM_002997 | 1 | GAGCAGGACUUCACCUUUG |
| | | | 2 | GGAGAAUACGGCUGUAGUG |
| | | | 3 | CCAAACAGGAGGAAUUCUA |
| | | | 4 | CGCAAAUUGUGGCUACUAA |
| ÜE | SPINT2 | NM_021102 | 1 | GAAGACCACUCCAGCGAUA |
| | | | 2 | GCAAUAACUUAUCUAUGG |
| | | | 3 | CCUGCCAGCUGUUUGUGUA |
| | | | 4 | CAGCAGGAAUGCAGCGGAU |
| ÜE | TAPBP | NM_172208 | 1 | GCACCACACUGCGAGAUGA |
| | | | 2 | GCACCUAUCUGGCCACCAU |
| | | | 3 | GAAAUUGGACCUUCUGGCU |
| | | | 4 | GCCUACAGUUCAACCCUUU |

Fortsetzung Tabelle 42: Auflistung der 106 siRNA-Pools und ihre Sequenzen

| Status | Gene Symbol | Gene ID (RefSeq) | # siRNA | Sequenz |
|--------|-------------|------------------|---------|----------------------|
| ÜE | TM4SF1 | NM_014220 | 1 | GGACCACUAUGUCUUGAUU |
| | | | 2 | GAUGCUUUCUUCUGUAUUG |
| | | | 3 | GGAUCUGGCUACUGUGUCA |
| | | | 4 | CAAAGUAUGCCUCCGAAAA |
| ÜE | UNC84B | NM_015374 | 1 | GCACACACCUCCUACUACA |
| | | | 2 | GCAAGAUCUCCACCCAUUGU |
| | | | 3 | CCUAUGGGCUGCAGACAUU |
| | | | 4 | CCACAGCCGUUACCUUAGA |
| ÜE | UNG | NM_003362 | 1 | CUACAGACAUAGAGGAUUU |
| | | | 2 | GAACUCGAAUGGCCUUGUU |
| | | | 3 | GCAGUGCCAUUGAUAGGAA |
| | | | 4 | CAAGCCAACUCUCAUAAGG |
| UE | ATF3 | NM_001030287 | 1 | GGUUUGCCAUCAGAACAA |
| | | | 2 | CACUGGUGUUUGAGGAUUU |
| | | | 3 | GCGACGAGAAAGAAUAAG |
| | | | 4 | AGACGGAGUGCCUGCAGAA |
| UE | BCKDK | NM_005881 | 1 | GCACGUGCAUGAGCUAUU |
| | | | 2 | GCAGAGGGCCUACGUGAGA |
| | | | 3 | GUACUCGUCUCUACCAAAA |
| | | | 4 | UGGCAGAGGGCCUACGUGA |
| UE | CCL2 | NM_002982 | 1 | UGUUUAUAACUUCACCAUA |
| | | | 2 | CUCGCGAGCUAUAGAAGAA |
| | | | 3 | CCAGUCACCUGCUGUUUAU |
| | | | 4 | CAGAGGCUCGCGAGCUAUA |
| UE | CHUK | NM_001278 | 1 | CAAAGAAGCUGACAAUACU |
| | | | 2 | CCAGAUACUUCUUAUAUA |
| | | | 3 | GAAGUUCGGUUUAGUAGCC |
| | | | 4 | AAAUUUGGCAUCUCCUUA |
| UE | DUSP1 | NM_004417 | 1 | CCAAUUGUCCCAACCAUUU |
| | | | 2 | CAACGAGGCCAUUGACUUC |
| | | | 3 | CCACCACCGUGUUAACUU |
| | | | 4 | GCAUAACUGCCUUGAUCAA |
| UE | EBI2 | NM_004951 | 1 | GAAAUUCUGGUGUAAACAAA |
| | | | 2 | GGAUUAUGUACUCCACUUA |
| | | | 3 | UACUGCGCUAGUGUUUUA |
| | | | 4 | GGGCAUGUUUCAUAGGAUA |
| UE | EDG6 | NM_003775 | 1 | GACGCUGGGUCUACUUAUG |
| | | | 2 | GUGCGGAGCAUCUGAAGUU |
| | | | 3 | GCACAGCCGGCUCUUAUGUU |
| | | | 4 | UGGCAACAUUGAAGUUCGA |
| UE | FOSL2 | NM_005253 | 1 | GGCCCAGUGUGCAAGAUUA |
| | | | 2 | GAAAUUCCGGGUAGAUUUG |
| | | | 3 | GCUCACCGCAGAAGCAGUA |
| | | | 4 | GCAGCUGUCUCCUGAAGAG |
| UE | GTF2F2 | NM_004128 | 1 | GAAAGAAGACGGAAGCGA |
| | | | 2 | UAGUCAAGGUUCCUAAAAU |
| | | | 3 | AGUCAGUGCUCCUAGAGAA |
| | | | 4 | GAAAACUACAUGCGAUUAA |
| UE | PTPN2 | NM_002828 | 1 | GAAACAGGAUUCAGUGUGA |
| | | | 2 | ACAAAGGAGUUAACUUAUA |
| | | | 3 | AAAGGGAGAUUCUAGUAUA |
| | | | 4 | AAACAGAAAUCGAAACAGA |

Fortsetzung Tabelle 42: Auflistung der 106 siRNA-Pools und ihre Sequenzen

| Status | Gene Symbol | Gene ID (RefSeq) | # siRNA | Sequenz |
|--------|-------------|------------------|---------|----------------------|
| UE | AURKB | NM_004217 | 1 | CAGAAGAGCUGCACAUUUG |
| | | | 2 | CCAAACUGCUCAGGCAUAA |
| | | | 3 | ACGCGGCACUUCACAAUUG |
| | | | 4 | UGGGACACCCGACAUCUUA |
| UE | ZNF22 | NM_006963 | 1 | GGGCAUGACUAUUCGAUUU |
| | | | 2 | UCACUUACCCUCUUGGAAA |
| | | | 3 | CAAGGAAAGGCCUAUGAGA |
| | | | 4 | GGUAUUUCUCGGAGCUCAA |
| PanIN | AGR2 | NM_006408 | 1 | GAAGAAAGCUCUCAAGUUG |
| | | | 2 | GAAAUUGGCAGAGCAGUUU |
| | | | 3 | CAGUCAAGCUUUAAGAAA |
| | | | 4 | AGUCAAAACUGGAGCCAAA |
| PanIN | C8ORF20 | NM_025232 | 1 | GAUGAGUGUUGGUCAGAU |
| | | | 2 | CCUCAGACGUGGACAGCUA |
| | | | 3 | AGAGAUCGUUACAGACAUU |
| | | | 4 | GAUCGACGCGUACAUUGUG |
| PanIN | CDC37 | NM_007065 | 1 | GCGAGGAGACAGCCAAUUA |
| | | | 2 | CACAAGACCUUCUGUGGAAA |
| | | | 3 | ACAAUCGUCAUGCAAUUUA |
| | | | 4 | GAGGAGAAAUGUGCACUCA |
| PanIN | CST3 | NM_000099 | 1 | GCACAAUGACCUUGUCGAA |
| | | | 2 | GCGUGGAGGAGGAGGGUGU |
| | | | 3 | AGGAAAGCAUUCUGCUCUU |
| | | | 4 | CCGUCGGCGAGUACAACAA |
| PanIN | CYP4F12 | NM_023944 | 1 | GCACAUGGACUUUCUGUAU |
| | | | 2 | GAAUGUAGGCUUGCAGUGA |
| | | | 3 | CCAUUGCACCCAAGGAUAA |
| | | | 4 | UCCCAGGGCUUUACGGUAU |
| PanIN | FOXA3 | NM_004497 | 1 | CAGGGAACAUGUUUGAGAA |
| | | | 2 | CCUCUAAGCUCUCCCUAUC |
| | | | 3 | GACCUUGAGUGAAAUCUAC |
| | | | 4 | UAUUCCCGCUCUUUGCUUA |
| PanIN | RAI3 | NM_003979 | 1 | GCAAUGGCCUGAAAUCCAA |
| | | | 2 | CAAAGACUAUGAAGUAAAG |
| | | | 3 | GCUCAUGCUUCCUGACUUU |
| | | | 4 | GCGCUGACCUUCCUCAUGU |
| PanIN | IFI27 | NM_005532 | 1 | AGUUGUGAUUGGAGGAGUU |
| | | | 2 | CAACUGGACUCUCCGGAUU |
| | | | 3 | CGGCUGUCAUUGCGAGGUU |
| | | | 4 | GGCCAGGAUUGCUACAGUU |
| PanIN | IL13RA1 | NM_001560 | 1 | GAAUACAUCUUGUUUCAUG |
| | | | 2 | GGAAACUCGUCGUUCAUA |
| | | | 3 | CCACAAUGAUGACCUAUUA |
| | | | 4 | CAAGAAAUGAGUAUAGGUA |
| PanIN | LGALS4 | NM_006149 | 1 | ACAUAGCUCUGCACAUAUA |
| | | | 2 | GCGAGCACAUAGAAGCGGUU |
| | | | 3 | GCUCGAAGAACCAUCAUA |
| | | | 4 | ACCCGACGCGUGCCUUAUA |
| PanIN | PLAC8 | NM_016619 | 1 | GAACAAGCGUCGCAAUAGAG |
| | | | 2 | GGAGAGCCAUGCGUACUUU |
| | | | 3 | CAGCUGAUUAUGAAUGAUG |
| | | | 4 | UGCCAAAUCAAGAGAGAUUA |

Fortsetzung Tabelle 42: Auflistung der 106 siRNA-Pools und ihre Sequenzen

| Status | Gene Symbol | Gene ID (RefSeq) | # siRNA | Sequenz |
|--------|-------------|------------------|---------|----------------------|
| PanIN | POLR3K | NM_016310 | 1 | GCGAACAUCCUCGUGCUUA |
| | | | 2 | AGAAGUGGAUGAUGUGCUU |
| | | | 3 | GCAGAUGAGCCGAUGACCA |
| | | | 4 | GCAAGGUAACAAAUCGGAA |
| PanIN | RAB34 | NM_031934 | 1 | AGACUUGCCUCAUUAUAG |
| | | | 2 | AGAAGAAGCCACAUUUG |
| | | | 3 | CAGGAGAGGUUCAAUGCA |
| | | | 4 | AGAAUGACCCUCCAGUGU |
| PanIN | RABAC1 | NM_006423 | 1 | CCUGUUACAUCUCUAUCU |
| | | | 2 | GCAGAUGGAACCCGUGUGA |
| | | | 3 | GCAGAAGGACCAGCAGAAA |
| | | | 4 | UACGCAACGUGGAGUACUA |
| PanIN | S100P | NM_005980 | 1 | GGACUUCAGUGAGUUAUC |
| | | | 2 | ACAAGGAUGCCGUGGAUAA |
| | | | 3 | GCACGCAGACCCUGACCAA |
| | | | 4 | GAAGGCAGGACUAAAUGA |
| PanIN | SQLE | NM_003129 | 1 | UAUUGAAGGUGUUGUGUUA |
| | | | 2 | UUUCAAAUCUUGGUGGCGAA |
| | | | 3 | CAAACUUGGUGGCGAAUGU |
| | | | 4 | GAGAUACAGUGGAAGGUCU |
| PanIN | TFF1 | NM_003225 | 1 | AGAAGAGGAGUGUGAAUUU |
| | | | 2 | CCUCCCAGUGUGCAAUAA |
| | | | 3 | GCCCAGACAGAGACGUGUA |
| | | | 4 | CAACACAGAUUGACUGCUC |
| C | BCL10 | NM_003921 | 1 | GCCACCAGAUCUACAGUUA |
| | | | 2 | GAAGAUUACAGAUAGUG |
| | | | 3 | GAAAUUUUCUUGUCGAACAU |
| | | | 4 | GGGCAUCCACUGUCAUGUA |
| C | BIRC5 | NM_001012270 | 1 | CAAAGGAAACCAACAUA |
| | | | 2 | GCAAAGGAAACCAACAUA |
| | | | 3 | CACCGCAUCUCUACAUA |
| | | | 4 | CCACUGAGAACGAGCCAGA |
| C | CCND1 | NM_053056 | 1 | GUUCGUGGCCUCUAAGAUG |
| | | | 2 | CCGAGAAGCUGUGCAUCUA |
| | | | 3 | GAACAGAAGUGCGAGGAGG |
| | | | 4 | ACAACUCCUGUCCUACUA |
| C | CLDN4 | NM_001305 | 1 | GGCUACAGGUAAUGGGCAU |
| | | | 2 | CCAUGGGGCUACAGGUAAU |
| | | | 3 | GUACCAACUGCCUGGAGGA |
| | | | 4 | CAACAUCAUCCAAGACUUC |
| C | KCMF1 | NM_020122 | 1 | GCUAUGGGCUGUGUAGAU |
| | | | 2 | GCUCGUAGAUCAAACUUGC |
| | | | 3 | UCGCAGAUUAAGUGUUUA |
| | | | 4 | GAGGCGAUCCUAAUCAUGU |
| C | MMP2 | NM_004530 | 1 | UACAACAGCUGCACUGAU |
| | | | 2 | GCAAACAGGACAUUGUAUU |
| | | | 3 | ACAAGAACCAGAUACAUA |
| | | | 4 | GACCAGAAUACCAUCGAGA |
| C | SERPINE1 | NM_000602 | 1 | GCUAUGGGAUUCAAGAUUG |
| | | | 2 | GGAGCACGGUCAAGCAAGU |
| | | | 3 | CUAGAGAACCUGGGAAUGA |
| | | | 4 | CGACAUGUUCAGACAGUUU |

Fortsetzung Tabelle 42: Auflistung der 106 siRNA-Pools und ihre Sequenzen

| Status | Gene Symbol | Gene ID (RefSeq) | # siRNA | Sequenz |
|--------|-------------|------------------|---------|----------------------|
| C | PLAU | NM_002658 | 1 | GCUCAAGGCUUAAACUCCAA |
| | | | 2 | GAAAAUGACUGUUGUGAAG |
| | | | 3 | ACACACUGCUUCAUUGAUU |
| | | | 4 | UGAGAUCACUGGCUUUGGA |
| C | RAB20 | | 1 | GUGGAUAUAUCCAGUCAUA |
| | | | 2 | GAGCAAAUGUGCUUUGAGA |
| | | | 3 | AUAAAAAGAUCCUCAAGUA |
| | | | 4 | GGGACAUGAACGUGGGGAA |
| C | DIABLO | NM_019887 | 1 | UAGAAGAGCUCCGUCAGAA |
| | | | 2 | GCAGAUCAAGGCCUCUAUAA |
| | | | 3 | CCGACAAUAUACAAGUUUA |
| | | | 4 | GGAAACCACUUGGAUGACU |
| C | TGFB1 | NM_004612 | 1 | GGAGUUGGAUUGCUGAAUU |
| | | | 2 | GCUGAAAGUCUCUAUGUUA |
| | | | 3 | CAGCUAGGCUUACAGCAUU |
| | | | 4 | CUGAAAGUCUCUAUGUUA |
| C | TGFB2 | NM_003242 | 1 | GAAUUGACAUCUCGCUGUA |
| | | | 2 | GAACAUAAACACUAGAGACA |
| | | | 3 | CAACAACGGUGCAGUCAAG |
| | | | 4 | CGCGGAAGCUCUAGGAGUU |
| C | TIMP2 | NM_003255 | 1 | GAAGGAAUAUCUCAUUGCA |
| | | | 2 | CGACAUCGAGGACCCAUAA |
| | | | 3 | UAUGAGAUAAGCAGAUAA |
| | | | 4 | GUAAAGAUAAACUGACGAU |
| C | BIRC4 | NM_001167 | 1 | GAGGAGGGCUAACUGAUUG |
| | | | 2 | GAGGAACCCUGCCAUUAU |
| | | | 3 | GCACGGAUCUUUACUUUUG |
| | | | 4 | GAACUGGGCAGGUUGUAGA |
| ÜE | CDC20 | NM_001255 | 1 | GCACAGUUCGCGUUCGAGA |
| | | | 2 | GGGCCGAACUCCUGGCAAA |
| | | | 3 | GCAGAAACGGCUUCGAAAU |
| | | | 4 | CGGAAGACCUGCCGUUACA |
| ÜE | DAPK3 | NM_001348 | 1 | GAACAUUCCUGGAUUAAGG |
| | | | 2 | CCACGCGUCUGAAGGAGUA |
| | | | 3 | GAGCCAGGCCCGUAAGUUC |
| | | | 4 | GAGGAGUACUUCAGCAACA |
| ÜE | EZH2 | NM_152998 | 1 | CAAAGAAUCUAGCAUCAUA |
| | | | 2 | GAGGACGGCUUCCCAAUAA |
| | | | 3 | GCUGAAGCCUCAUUGUUA |
| | | | 4 | GAAUGGAAACAGCGAAGGA |
| ÜE | ITCH | NM_031483 | 1 | GAAACUACAUGUUCAGAAA |
| | | | 2 | GAGAAGAAGGUUUGAUUA |
| | | | 3 | CAACAUGGGACGUUUUUUAU |
| | | | 4 | GAAAUUAAGAGUCAUGAUC |
| ÜE | JARID1B | NM_006618 | 1 | CCACAGAGCUUUGUUGAGAA |
| | | | 2 | GCAGAGGCCAUGAAUUAUA |
| | | | 3 | CAACAGAACCUCUAUUUUG |
| | | | 4 | GGAGAUGCACUUCGAUUAUA |
| ÜE | KIF20A | NM_005733 | 1 | GCAAGAACCUGCUAUCAGA |
| | | | 2 | GAAGAGGGCCAGAAGAAUA |
| | | | 3 | GCAAUGAGAUGGUAGAACA |
| | | | 4 | CUGAAGAGUUGCAUAAGUA |

Fortsetzung Tabelle 42: Auflistung der 106 siRNA-Pools und ihre Sequenzen

| Status | Gene Symbol | Gene ID (RefSeq) | # siRNA | Sequenz |
|--------|-------------|------------------|---------|----------------------|
| ÜE | MAPRE2 | NM_014268 | 1 | GAAUGGCGGUCAAUGUGUA |
| | | | 2 | GAACGUUGAUAAAGGUAUU |
| | | | 3 | GGAGUAUGAUCCUGUAGAG |
| | | | 4 | UGCAUGGGUUAUGACAU |
| ÜE | MELK | NM_014791 | 1 | GACUAAAAGCUUCACUAUA |
| | | | 2 | UCACUACGCCAAAUCGUUA |
| | | | 3 | GAACCAGCAUAAGAGAGAA |
| | | | 4 | CCAAAAGACUCCAGUUAUA |
| ÜE | MET | NM_000245 | 1 | GAAGAUCAGUUUCUAAUU |
| | | | 2 | CCAGAGACAUGUAUGAUAA |
| | | | 3 | GAACAGAAUCACUGACAU |
| | | | 4 | GAAACUGUAUGCUGGAUGA |
| ÜE | MRE11A | NM_005591 | 1 | GAUGAGAACUCUUGGUUA |
| | | | 2 | GAAAGGCUCUAUCGAAUGU |
| | | | 3 | GCUAAUGACUCUGAUGAU |
| | | | 4 | GAGUAUAGAUUAGCAGAA |
| ÜE | MST1R | NM_002447 | 1 | GUGGAGCGCUGUUGUGAAU |
| | | | 2 | GACAGGGAGUACUAUAGUG |
| | | | 3 | CGACCCACCUUCAGAGUAC |
| | | | 4 | UAGAGGAGUUUGAGUGUGA |
| ÜE | NT5E | NM_002526 | 1 | GAACUGGCUGCUGUAUUG |
| | | | 2 | GGAAGUCACUGCCAUGGAA |
| | | | 3 | UGAAAUCACUGCAUUACAA |
| | | | 4 | GGACUUUAUUUGCCAUAUA |
| ÜE | PAK4 | NM_001014834 | 1 | GGAUAAUGGUGAUUGAGAU |
| | | | 2 | GGGUGAAGCUGUCAGACUU |
| | | | 3 | AGAAUGUGGUGGAGAUUGUA |
| | | | 4 | CCAUGAAGAUGAUUCGGGA |
| ÜE | PKM2 | NM_002654 | 1 | GAAAGAACAUAAGAUAUU |
| | | | 2 | GCAUUGAGAUUCCUGCAGA |
| | | | 3 | GAUCAGUGGAGACGUUGAA |
| | | | 4 | CCAUGUGAAGCCGGGACU |
| ÜE | PRKCZ | NM_002744 | 1 | GAACGAGGACGCCGACCUU |
| | | | 2 | GACCAAAUUUACGCCAUGA |
| | | | 3 | GGUUGUCCUGGUCAUUGA |
| | | | 4 | CGUCAAAAGCCUCCAUGUU |
| ÜE | PRKD2 | NM_001079882 | 1 | UGAGACACCUUCACUUCAA |
| | | | 2 | CAAGAACAUUGUCCACUGU |
| | | | 3 | GGAAGAUGGGAGAGCGAU |
| | | | 4 | CGACACACGACGCGGAAAU |
| ÜE | PRKDC | NM_006904 | 1 | GCAAAGAGGUGGCAGUUA |
| | | | 2 | GAGCAUCACUUGCCUUUA |
| | | | 3 | GAUGAGAAGUCCUAGGUA |
| | | | 4 | GCAGGACCGUGCAAGGUUA |
| ÜE | RAD50 | NM_005732 | 1 | GAAACAAACUGCAGAAUGU |
| | | | 2 | GAACAAGGAUCUGGAUAUU |
| | | | 3 | GCUCAGAGAUUGUGAAUG |
| | | | 4 | UAACCUACUGUUGGGAUA |
| ÜE | RALB | NM_002881 | 1 | GAAAGAUGUUGCUUACUAU |
| | | | 2 | GAAAUCAAGAACAAAGAAGA |
| | | | 3 | UACCAAAGCUGACAGUUAU |
| | | | 4 | AGACAAGAAUGGCAAGAAA |

Fortsetzung Tabelle 42: Auflistung der 106 siRNA-Pools und ihre Sequenzen

| Status | Gene Symbol | Gene ID (RefSeq) | # siRNA | Sequenz |
|--------|-------------|------------------|---------|----------------------|
| ÜE | RRAS | NM_006270 | 1 | GGAAAUACCAGGAACAAGA |
| | | | 2 | GUUUCAACGAGGUGGGCAA |
| | | | 3 | CCGUUGUGUUGGUCGGGAA |
| | | | 4 | CCGGAAAUACCAGGAACAA |
| ÜE | SMURF1 | NM_181349 | 1 | GCACUAUGAUCUAUAUGUU |
| | | | 2 | AAAGAGAUCUAGUCCAGAA |
| | | | 3 | GGAAGAAGGUUUGGAUUAC |
| | | | 4 | AGUAGGGUGUGGACGCAAA |
| ÜE | SRPK1 | NM_003137 | 1 | GAAGUCAGUUCGCAAUUCA |
| | | | 2 | GAACACAUUCUGCAUGGU |
| | | | 3 | UCACGAAGCUGAAACCUUG |
| | | | 4 | GUUACAGGGUCUUGAUUUAU |
| ÜE | SUV39H1 | NM_003173 | 1 | GAACCUCUAUGACUUUGAA |
| | | | 2 | CCAACUACCUGGUGCAGAA |
| | | | 3 | CUAAGAAGCGGUGCCGUAU |
| | | | 4 | GGUGAAAUGGCGUGGAUUAU |
| ÜE | TMPRSS4 | NM_001083947 | 1 | GAACAGCCUCGAUGUCAAA |
| | | | 2 | CGAGGAAGCAGCUGUGUGA |
| | | | 3 | GUACUAGGUUCUUAGGAAA |
| | | | 4 | GAGUGGAAACUAAGGUGAU |
| ÜE | TRIO | NM_007118 | 1 | GAUAAGAGGUACAGAGAUU |
| | | | 2 | GGAAGUCGCUCCUUGACAA |
| | | | 3 | CAACGGAGAGUCCAUGUUA |
| | | | 4 | GAACACCAACUUCAGAUAA |
| ÜE | TSG101 | NM_006292 | 1 | AAACUGAGAUGGCGGAUGA |
| | | | 2 | GAACCUCACUGGAACAAUC |
| | | | 3 | CCGUUUAGAUCAAGAAGUA |
| | | | 4 | UCCACAGCUCCCUUAUAC |

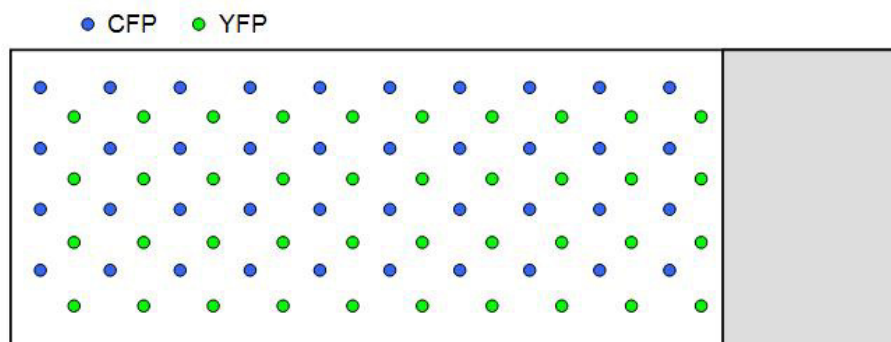


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Verteilung der CFP- und YFP-Spots auf den „Reverse Transfection“-Microarrays. Die CFP- und YFP-Fluoreszenz-Konstrukte für die 79 Kandidatengene wurden in einem alternierenden Muster auf die Objektträger gespottet. blaue Kreise = CFP-Konstrukte; grüne Kreise = YFP-Konstrukte

7.2.2 Dokumentation der subzellulären Lokalisation

Tabelle 43: Subzelluläre Lokalisation in HEK-293-Zellen.

Zusammenfassung der in den parallelisierten Assays ermittelten Lokalisationen der Fusionsproteine.

| Gene Symbol | CFP-Kanal | YFP-Kanal |
|--------------------|-------------------|-----------------------|
| ADRBK1 | CP / NUC | |
| AMF / GPI | CP | |
| AMFR | / | CP, Orgs |
| Amplaxin / CTTN | CP | |
| ANXA2 / Lipocortin | CP | |
| BAX | CP und / oder NUC | CP / NUC |
| CCL14 | Orgs | CP / NUC / Orgs |
| CFL1 | CP / NUC | |
| CLDN7 | Orgs | |
| CNK/CNKSR1 | CP | |
| CNR2 | / | / |
| COPEB/KLF6 | CP / NUC | |
| CPNE1 | CP und / oder NUC | |
| CRABP1 | CP / NUC | |
| CTSE | / | CP / Orgs |
| DDR1 | CP | / |
| EDNRA | CP | CP / Mem / Orgs |
| ELF3 | NUC | / |
| FASTK | CP | CP und / oder NUC |
| G2AN/GANAB | / | / |
| GSPT1 | CP / Orgs | / |
| H1F0 | / | NUC |
| LGALS3 | CP und / oder NUC | |
| MAP3K11 | CP / Orgs | / |
| MARVELD1 | CP / Mem / Orgs | |
| NFATC1 | CP / Orgs | |
| NKX2-5 | NUC | |
| PCTK1 | CP / Orgs | |
| PPM1G | NUC | |
| PPP2R1A | CP und / oder NUC | |
| PPP2R4 | CP / NUC | |
| PROC | / | CP |
| PRSS25/HTRA2 | / | CP / Orgs / Mem |
| SDC1 | / | CP / Orgs / Mem |
| SPINT2 | / | CP / Orgs |
| TAPBP | / | CP / Orgs |
| TM4SF1 | CP / Orgs | CP / Orgs / Mem |
| UNC84B | CP / Orgs | |
| UNG | CP | |
| ATF3 | NUC | CP und / oder NUC |
| BCKD/BCKDK | CP / Orgs | |
| CCL2 | CP / Orgs | |
| DUSP1 | / | CP und / oder NUC |
| EBI2 | / | CP / Orgs / Mem |
| EDG6 | / | CP / Orgs / Mem |
| FRA-2, FOSL2 | NUC | |
| GTF2F2 | CP / Orgs | |
| PTPN2 | / | CP und / oder NUC |
| STK12/AURKB | CP | CP / Orgs, teilw. NUC |

Fortsetzung Tabelle 43: Subzelluläre Lokalisation in HEK-293-Zellen. Zusammenfassung der in den parallelisierten Assays ermittelten Lokalisationen der Fusionsproteine.

| Gene Symbol | CFP-Kanal | YFP-Kanal |
|-----------------|-----------------|-----------------------|
| ZNF22 | / | CP / Orgs |
| AGR2 | / | CP / NUC |
| C8orf20/REEP4 | CP / Orgs | / |
| CDC37 | CP | / |
| CST3 | / | / |
| CYP4F12 | CP oder NUC | / |
| FOXA3 | CP oder NUC | CP und / oder NUC |
| IFI27 | CP | CP und / oder NUC |
| IL13RA1 | / | / |
| LGALS4 | CP / NUC | |
| PLAC8 | CP / Orgs / Mem | CP / Orgs, teilw. NUC |
| POLR3K | CP / NUC | / |
| RAB34 | CP / NUC | / |
| RABAC1 | CP / Orgs | |
| S100P | CP / NUC | |
| SQLE | CP | |
| TFF1 | / | CP |
| BCL-10 | CP / Orgs | / |
| BIRC5 | CP | CP / Orgs |
| CCND1 | CP / Orgs | CP |
| CLDN4 | CP / Orgs / Mem | |
| KCMF1 | / | / |
| MMP2 | / | / |
| PAI-1/ SERPINE1 | CP | |
| Rab20 | CP / NUC | |
| Smac/DIABLO | CP / Orgs | |
| TGFBR1 (c.a.) | CP / Orgs | / |
| TGFBR2 (d.n.) | / | / |
| TIMP2 | / | / |
| XIAP/BIRC4 | CP | |

Tabelle 44: Subzelluläre Lokalisation in PANC-1-Zellen. Zusammenfassung der in den parallelisierten Assays ermittelten Lokalisationen der Fusionsproteine in An- bzw. Abwesenheit von FBS

| | FBS 10% | | FBS 0% | |
|--------------------|-----------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| Gene Symbol | CFP-Kanal | YFP-Kanal | CFP-Kanal | YFP-Kanal |
| ADRBK1 | CP / NUC | | CP / NUC | |
| AMF / GPI | CP | CP, teilw. NUC | CP | CP, teilw. NUC |
| AMFR | / | / | / | CP, teilw. NUC |
| Amplaxin / CTTN | CP oder CP / NUC | | CP / Orgs | CP / NUC |
| ANXA2 / Lipocortin | CP | | CP | |
| BAX | CP / NUC | | CP / NUC | |
| CCL14 | / | CP / Orgs | CP / NUC | |
| CFL1 | CP / NUC | | CP / NUC | |
| CLDN7 | Orgs | | Orgs | CP / Orgs |
| CNK/CNKSRI | CP | Mem / Orgs | / | CP |
| CNR2 | / | / | / | / |
| COPEB/KLF6 | CP / NUC | | CP / NUC | |
| CPNE1 | CP / NUC | | / | CP / NUC |
| CRABP1 | CP / NUC | | CP / NUC | |
| CTSE | CP | CP / Orgs | CP / NUC / Orgs | CP / NUC |
| DDR1 | / | CP | CP / NUC | / |
| EDNRA | / | Orgs | / | / |
| ELF3 | CP / Orgs, teilw. NUC | | CP / NUC | NUC |
| FASTK | NUC | CP und / oder NUC | CP | CP / NUC |
| G2AN/GANAB | CP | / | / | / |
| GSPT1 | CP und / oder NUC | | CP / NUC | / |
| H1F0 | NUC | | / | NUC |
| LGALS3 | CP / NUC | | CP / NUC | |
| MAP3K11 | CP / Orgs | / | CP / NUC | / |
| MARVELD1 | CP / Orgs | | CP / NUC / Orgs | Orgs / Mem |
| NFATC1 | CP / Orgs | | CP / NUC / Orgs | |
| NKX2-5 | NUC | | NUC | |
| PCTK1 | CP | | NUC | CP / NUC |
| PPM1G | NUC | | / | CP / NUC |
| PPP2R1A | NUC | | / | CP / NUC |
| PPP2R4 | CP / NUC | | CP / NUC | |
| PROC | / | NUC | / | Orgs |
| PRSS25/HTRA2 | / | Mem | / | CP / Orgs |
| SDC1 | CP | CP / Orgs / Mem | CP | CP / Orgs / Mem |
| SPINT2 | / | CP / Orgs | CP / NUC | CP / NUC / Orgs |
| TAPBP | / | CP / Orgs | CP | CP / Orgs / Mem |
| TM4SF1 | / | CP / Orgs / Mem | CP | CP / Orgs / Mem |
| UNC84B | CP / NUC | CP / Orgs / Mem | CP / Orgs / Mem | Orgs / Mem |
| UNG | / | / | CP / NUC | CP |
| ATF3 | CP und / oder NUC | | CP / NUC / Orgs | |
| BCKD/BCKDK | CP / Orgs | | CP / NUC / Orgs | |
| CCL2 | CP und / oder NUC | | CP / Mem | CP / NUC |
| DUSP1 | / | CP | CP / NUC | |
| EBI2 | / | Orgs / Mem | CP | CP / Orgs / Mem |
| EDG6 | CP | CP / Orgs / Mem | CP | CP / Orgs |
| FRA-2, FOSL2 | CP und / oder NUC | | CP / NUC | |
| GTF2F2 | CP und / oder NUC | | / | CP / NUC |
| PTPN2 | / | CP / NUC | / | CP / NUC |
| STK12/AURKB | / | CP und / oder NUC | CP / NUC / Orgs | |
| ZNF22 | / | CP oder NUC | CP / NUC | NUC / Mem |

Fortsetzung Tabelle 44: Subzelluläre Lokalisation in PANC-1-Zellen. Zusammenfassung der in den parallelisierten Assays ermittelten Lokalisationen der Fusionsproteine in An- bzw. Abwesenheit von FBS.

| Gene Symbol | FBS 10% | | FBS 0% | |
|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|------------|
| | CFP-Kanal | YFP-Kanal | CFP-Kanal | YFP-Kanal |
| AGR2 | / | / | CP / NUC | |
| C8orf20/REEP4 | CP / Orgs | / | CP / NUC | / |
| CDC37 | / | / | CP / NUC | / |
| CST3 | CP und / oder NUC | / | CP / NUC | |
| CYP4F12 | / | CP / Orgs | / | CP / NUC |
| FOXA3 | CP | CP / NUC | CP / NUC | |
| IFI27 | CP | CP / NUC | CP / NUC | |
| IL13RA1 | / | / | CP / Orgs | CP / NUC |
| LGALS4 | CP / NUC | | CP / NUC | |
| PLAC8 | CP / Orgs | CP / NUC | CP / NUC | |
| POLR3K | CP / NUC | / | CP / NUC | |
| RAB34 | CP | / | CP / NUC | |
| RABAC1 | CP | CP / Orgs | CP / NUC | CP / Orgs |
| S100P | CP / NUC | CP / Orgs | CP / NUC | |
| SQLE | CP | / | CP / Orgs | / |
| TFF1 | / | / | CP / NUC | / |
| BCL-10 | CP / Orgs | / | CP / Orgs | NUC / Orgs |
| BIRC5 | CP und / oder NUC | CP oder NUC | CP | CP / NUC |
| CCND1 | CP / NUC | / | CP / NUC | / |
| CLDN4 | CP / Orgs / Mem | | CP / Orgs / Mem | |
| KCMF1 | / | / | / | / |
| MMP2 | / | CP | CP | / |
| PAI-1/ SERPINE1 | CP und / oder NUC | CP | CP | CP / Orgs |
| Rab20 | CP / NUC | | CP / NUC | |
| Smac/DIABLO | / | CP / NUC / Orgs | CP / NUC / Orgs | |
| TGFBR1 (c.a.) | / | / | / | / |
| TGFBR2 (d.n.) | / | / | / | / |
| TIMP2 | CP / NUC | / | CP / NUC | / |
| XIAP/BIRC4 | CP / NUC | CP | / | CP / NUC |

Tabelle 45: Subzelluläre Lokalisation in S2-007-Zellen. Zusammenfassung der in den parallelisierten Assays ermittelten Lokalisationen der Fusionsproteine in An- bzw. Abwesenheit von FBS.

| Gene Symbol | FBS 10% | | FBS 0% | |
|--------------------|-------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| | CFP-Kanal | YFP-Kanal | CFP-Kanal | YFP-Kanal |
| ADRBK1 | CP / NUC | | CP / NUC | |
| AMF / GPI | CP | | CP / NUC | CP |
| AMFR | Orgs / Mem | | CP | CP / NUC / Orgs |
| Amplaxin / CTTN | CP | | CP / NUC / Orgs | CP |
| ANXA2 / Lipocortin | CP | | CP | / |
| BAX | CP / NUC | | CP / NUC | / |
| CCL14 | CP / Orgs | | / | CP / Orgs |
| CFL1 | CP / NUC | | CP / NUC | |
| CLDN7 | Orgs | | Orgs | |
| CNK/CNKSR1 | / | CP / Orgs / Mem | CP | |
| CNR2 | / | / | / | / |
| COPEB/KLF6 | CP / NUC | | CP / NUC | |
| CPNE1 | CP / NUC | CP / Orgs | CP / NUC | |
| CRABP1 | CP / NUC | | CP / NUC | |
| CTSE | CP / Orgs | | / | Orgs |
| DDR1 | / | / | CP | / |
| EDNRA | CP / Mem | CP / Orgs / Mem | CP / Mem | / |
| ELF3 | NUC / Orgs | CP / Orgs | CP / NUC | CP / NUC / Orgs |
| FASTK | CP und / oder NUC | | Orgs | CP / NUC / Orgs |
| G2AN/GANAB | / | / | CP | / |
| GSPT1 | CP und / oder NUC | CP | CP | Orgs |
| H1F0 | NUC | | NUC | |
| LGALS3 | CP / NUC | | CP / NUC | |
| MAP3K11 | CP | / | CP / NUC / Orgs | CP / Orgs |
| MARVELD1 | CP / Orgs / Mem | | CP / Orgs | |
| NFATC1 | CP / Orgs | | CP / NUC / Orgs | |
| NKX2-5 | NUC | | NUC | |
| PCTK1 | CP | | CP | |
| PPM1G | NUC | | NUC | |
| PPP2R1A | CP und / oder NUC | | CP / NUC | / |
| PPP2R4 | CP / NUC | | CP / NUC | |
| PROC | CP | CP und / oder NUC | / | CP |
| PRSS25/HTRA2 | / | CP / Mem | / | CP / Mem |
| SDC1 | / | CP / Orgs / Mem | CP | CP / Orgs / Mem |
| SPINT2 | CP | CP / Orgs, teilw. NUC | CP / Orgs | |
| TAPBP | CP | CP / Orgs / Mem | CP | |
| TM4SF1 | CP / Orgs / Mem | | CP | Mem |
| UNC84B | / | / | NUC | CP / Mem |
| UNG | / | CP / Orgs / Mem | NUC | CP / NUC / Orgs |
| ATF3 | CP und / oder NUC | | NUC | CP / NUC / Orgs |
| BCKD/BCKDK | CP / Orgs | Orgs | Orgs | |
| CCL2 | CP / NUC / Orgs | | CP | CP / NUC / Orgs |
| DUSP1 | CP / Orgs | CP / NUC / Orgs | CP / NUC | CP / NUC / Mem |
| EBI2 | / | CP / Orgs / Mem | CP | CP / Mem |
| EDG6 | CP / Orgs | Orgs / Mem | CP / Mem | |
| FRA-2, FOXL2 | NUC, teilw. CP | | NUC | |
| GTF2F2 | CP / NUC | | CP | CP / NUC / Mem |
| PTPN2 | / | CP und / oder NUC | CP / NUC | / |
| STK12/AURKB | / | CP / NUC / Orgs | Orgs | CP / NUC |

Fortsetzung Tabelle 45: Subzelluläre Lokalisation in S2-007-Zellen. Zusammenfassung der in den parallelisierten Assays ermittelten Lokalisationen der Fusionsproteine in An- bzw. Abwesenheit von FBS.

| | FBS 10% | | FBS 0% | |
|-----------------|-------------------|-------------------|-----------|-----------------|
| Gene Symbol | CFP-Kanal | YFP-Kanal | CFP-Kanal | YFP-Kanal |
| ZNF22 | Orgs | CP / NUC | / | / |
| AGR2 | / | / | CP / NUC | / |
| C8orf20/REEP4 | CP / Mem | / | Orgs | |
| CDC37 | CP und / oder NUC | / | CP / NUC | / |
| CST3 | CP / NUC | | CP / NUC | / |
| CYP4F12 | / | CP / NUC | / | / |
| FOXA3 | CP / NUC | | CP / NUC | |
| IFI27 | / | CP / NUC | CP / NUC | |
| IL13RA1 | / | CP / NUC | / | / |
| LGALS4 | CP / NUC | | CP / NUC | |
| PLAC8 | CP und / oder NUC | CP / NUC | CP / NUC | |
| POLR3K | CP / NUC | | CP / NUC | |
| RAB34 | CP / NUC | / | / | CP / NUC |
| RABAC1 | CP / Orgs | | CP / Orgs | |
| S100P | CP / NUC | CP / NUC / Orgs | CP / NUC | CP / NUC / Orgs |
| SQLE | CP | / | CP | CP / Orgs |
| TFF1 | / | CP und / oder NUC | / | CP / NUC |
| BCL-10 | CP / Orgs | / | Orgs | NUC / Orgs |
| BIRC5 | CP | | CP / NUC | CP / Orgs / Mem |
| CCND1 | CP / NUC / Orgs | CP / NUC | CP | Orgs |
| CLDN4 | Orgs / Mem | | CP / Mem | |
| KCMF1 | / | / | / | CP / NUC |
| MMP2 | Orgs | / | CP / NUC | / |
| PAI-1/ SERPINE1 | CP | | CP / NUC | |
| Rab20 | CP / NUC | | CP / NUC | |
| Smac/DIABLO | CP / Orgs | | CP / Orgs | |
| TGFBR1 (c.a.) | CP / Orgs / Mem | / | CP / Orgs | / |
| TGFBR2 (d.n.) | / | / | / | CP / NUC |
| TIMP2 | / | CP / NUC | CP / NUC | / |
| XIAP/BIRC4 | CP | CP und / oder NUC | / | CP |

Tabelle 46: Vergleichende Auswertung der subzellulären Lokalisation. Analyse bezüglich der Kategorien „HEK vs. transf.“, „FBS 10% vs. 0%“ und „CFP vs. YFP“ (vgl. Kap. 4.1.2) sowie Dokumentation ungewöhnlicher Morphologien in den 3 verschiedenen Zelllinien.

| Gen | Lokalisation | | | Morphologie | | |
|--------------------|-----------------|-----------------|-------------|-------------|--------|--------|
| | HEK vs. Transf. | FBS 10 % vs. 0% | CFP vs. YFP | HEK-293 | PANC-1 | S2-007 |
| ADRBK1 | | + | | | | |
| AMF / GPI | + | + | + | | | |
| AMFR | | | | | | |
| Amplaxin / CTTN | + | | | | | |
| ANXA2 / Lipocortin | | + | | | + | |
| BAX | | | | | | |
| CCL14 | | ++ | | | | |
| CFL1 | | + | | | | |
| CLDN7 | | | | | | |
| CNK/CNKSR1 | | | | | | |
| CNR2 | | | | | | |
| COPEB/KLF6 | | | | | | |
| CPNE1 | + | | | | | |
| CRABP1 | | | | | | |
| CTSE | | + | | | | |
| DDR1 | | + | | | | |
| EDNRA | | | | | | |
| ELF3 | + | + | + | | | |
| FASTK | | ++ | + | | | |
| G2AN/GANAB | | | | | | |
| GSPT1 | + | + | | | | |
| H1F0 | | | | | | |
| LGALS3 | + | | | | | |
| MAP3K11 | | + | | | | |
| MARVELD1 | | | | | | |
| NFATC1 | | ++ | | | | |
| NKX2-5 | | | | | | |
| PCTK1 | | ++ | | | | |
| PPM1G | | ++ | | | | |
| PPP2R1A | + | ++ | | | | |
| PPP2R4 | | | | | | |
| PROC | | + | | | | |
| PRSS25/HTRA2 | | | | | | |
| SDC1 | | | | | | |
| SPINT2 | | | | | | |
| TAPBP | | | | | | |
| TM4SF1 | | | | | | |
| UNC84B | + | | + | | | |
| UNG | | + | | | | |
| ATF3 | | | | | | |
| BCKD/BCKDK | | | | | | |
| CCL2 | + | | | | | |
| DUSP1 | | | | | | |
| EBI2 | | | | | | |
| EDG6 | | | | | | |
| FRA-2, FOXL2 | ++ | ++ | | | | |
| GTF2F2 | ++ | + | | | | |
| PTPN2 | | | | | | |
| STK12/AURKB | | | | | | |

Fortsetzung Tabelle 46: Vergleichende Auswertung der subzellulären Lokalisation. Analyse bezüglich der Kategorien „HEK vs. transf.“, „FBS 10% vs. 0%“ und „CFP vs. YFP“ (vgl. Kap. 4.1.2) sowie Dokumentation ungewöhnlicher Morphologien in den 3 verschiedenen Zelllinien.

| Gen | Lokalisation | | | Morphologie | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|-------------|--------|--------|
| | HEK vs. Transf. | FBS 10 % vs. 0% | CFP vs. YFP | HEK-293 | PANC-1 | S2-007 |
| ZNF22 | | | | | | |
| AGR2 | | | | | | |
| C8orf20/REEP4 | | | | | | |
| CDC37 | | | | | | |
| CST3 | | | | | | |
| CYP4F12 | | | | | | |
| FOXA3 | + | | + | | | |
| IFI27 | | | ++ | | | |
| IL13RA1 | | | | | | |
| LGALS4 | | + | | | | |
| PLAC8 | | | + | | | |
| POLR3K | | | | | + | |
| RAB34 | + | + | | | | |
| RABAC1 | | | | | | |
| S100P | | | | | | |
| SQLE | | | | | | |
| TFF1 | | | | | | |
| BCL-10 | | | | | | |
| BIRC5 | + | + | | | | |
| CCND1 | ++ | ++ | | | | |
| CLDN4 | | | | | | |
| KCMF1 | | + | | | | |
| MMP2 | | | | | | |
| PAI-1/ SERPINE1 | + | ++ | + | | | |
| Rab20 | | | | | | |
| Smac/DIABLO | | + | | | | |
| TGFB1 (c.a.) | | | | | | |
| TGFB2 (d.n.) | | | | | | |
| TIMP2 | | | | | | |
| XIAP/BIRC4 | + | | + | | | |

Tabelle 47: Subzelluläre Lokalisation in HEK-293-Zellen. Zusammenfassung der in den PaCaNet-Experimenten ermittelten Lokalisationen der Fusionsproteine in An- bzw. Abwesenheit von FBS.

| | FBS 10% | | FBS 0% | |
|-------------|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------|
| Gene Symbol | CFP-Kanal | YFP-Kanal | CFP-Kanal | YFP-Kanal |
| CDC20 | CP / Orgs, teilw. NUC | / | CP / Orgs | CP |
| MAPRE2 | CP | | CP | |
| PKM2 | CP / Orgs / Artefakte | | CP / Orgs | |
| TGS101 | Orgs | / | CP / Orgs | / |
| NT5E | Orgs | Orgs / Mem | CP / Mem | CP / Orgs |
| EZH2 | NUC / Orgs, teilw. CP | | NUC | |
| MRE11A | / | CP, teilw. NUC | / | CP / NUC |
| SUV39H1 | Orgs, teilw. NUC | | CP / Orgs | Orgs |
| RALB | CP / NUC | CP / Orgs / Mem | CP / NUC | |
| SRPK1 | CP / Mem | | CP | |
| PRKCZ | CP, teilw. Orgs | | CP / Mem / Orgs | CP |
| RRAS | Orgs / Mem | CP / Orgs / Mem | CP | |

Tabelle 48: Subzelluläre Lokalisation in PANC-1-Zellen. Zusammenfassung der in den PaCaNet-Experimenten ermittelten Lokalisationen der Fusionsproteine in An- bzw. Abwesenheit von FBS.

| | FBS 10% | | FBS 0% | |
|-------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| Gene Symbol | CFP-Kanal | YFP-Kanal | CFP-Kanal | YFP-Kanal |
| CDC20 | CP / Orgs, teilw. NUC | / | CP / Orgs | |
| MAPRE2 | CP, teilw. NUC | | CP | CP, teilw. NUC |
| PKM2 | CP / Orgs, teilw. NUC & Artefakte | | CP | |
| TGS101 | Orgs | / | Orgs | CP / Orgs |
| NT5E | Orgs | Orgs / Mem | CP / Orgs | |
| EZH2 | NUC / Orgs, teilw. CP | | CP / NUC | CP / NUC |
| MRE11A | / | CP, teilw. NUC | CP, teilw. NUC | |
| SUV39H1 | Orgs, teilw. NUC | | CP / Orgs, teilw. NUC | NUC / Orgs |
| RALB | CP / NUC | CP / Orgs / Mem | CP / NUC | CP / Orgs / Mem |
| SRPK1 | CP / Mem | | CP | CP / NUC |
| PRKCZ | CP, teilw. Orgs | | CP / Orgs / Mem | CP, teilw. NUC |
| RRAS | Orgs / Mem | CP / Orgs / Mem | CP | |

Tabelle 49: Subzelluläre Lokalisation in S2-007-Zellen. Zusammenfassung der in den PaCaNet-Experimenten ermittelten Lokalisationen der Fusionsproteine in An- bzw. Abwesenheit von FBS.

| | FBS 10% | | FBS 0% | |
|-------------|-----------------------|------------------|------------------------|------------|
| Gene Symbol | CFP-Kanal | YFP-Kanal | CFP-Kanal | YFP-Kanal |
| CDC20 | CP / Orgs, teilw. NUC | / | Orgs | / |
| MAPRE2 | CP | | CP | |
| PKM2 | CP / Orgs / Artefakte | | CP | CP / Orgs |
| TGS101 | Orgs | / | Orgs, teilw. CP | / |
| NT5E | Orgs | Orgs / Mem | CP / Orgs | |
| EZH2 | NUC / Orgs, teilw. CP | | CP / Orgs, teilws. NUC | Orgs |
| MRE11A | / | CP, teilw. NUC | CP / NUC | |
| SUV39H1 | Orgs, teilw. NUC | Orgs, teilw. NUC | CP / Orgs | NUC / Orgs |
| RALB | CP / NUC | CP / Orgs / Mem | CP / NUC | CP / Orgs |
| SRPK1 | CP / Mem | | CP | |
| PRKCZ | CP, teilw. Orgs | | CP / Mem | CP / NUC |
| RRAS | Orgs / Mem | CP / Orgs / Mem | CP | CP / Orgs |

7.2.3 Dokumentation der funktionellen Effekte nach der Überexpression der Kandidatengene

Tabelle 50: Evaluation der funktionellen Assays. Zusammenfassung der im parallelisierten Verfahren ermittelten Effekte bezüglich der zellulären Funktionen Apoptose und Proliferation, analysiert mit 3 verschiedenen Antikörpern in den Zelllinien HEK-293 und PANC-1.

| Gen | Apoptose | | | Proliferation | | | |
|--------------------|---------------|--------|--------|---------------|--------|----------------|--------|
| | Caspase-Assay | | | Ki67-Assay | | CyclinB1-Assay | |
| | HEK-293 | PANC-1 | S2-007 | HEK-293 | PANC-1 | HEK-293 | PANC-1 |
| ADRBK1 | + | | | | | | |
| AMF / GPI | | | | | | | |
| AMFR | | | | | | | |
| Amplaxin / CTTN | | | ++ | | | | |
| ANXA2 / Lipocortin | | | | | | | |
| BAX | | | | | | | |
| CCL14 | | | | | | | |
| CFL1 | | | | | | | |
| CLDN7 | ++ | ++ | ++ | | | | |
| CNK/CNKSR1 | + | | | | | | |
| CNR2 | | | | | | | |
| COPEB/KLF6 | + | | | + | | | |
| CPNE1 | | | | | | | |
| CRABP1 | | | | + | | | |
| CTSE | | | | | | | |
| DDR1 | | | | | | | |
| EDNRA | | | | | | | |
| ELF3 | | | ++ | | | | |
| FASTK | | | | | | | |
| G2AN/GANAB | | | | | | | |
| GSPT1 | | | | | | | |
| H1F0 | + | + | | | | | |
| LGALS3 | | | | | | | |
| MAP3K11 | + | | | | | | |
| MARVELD1 | + | | | | | | + |
| NFATC1 | | | | | | | |
| NKX2-5 | ++ | + | + | (+) | | | |
| PCTK1 | | | | | | | |
| PPM1G | + | | | | | | |
| PPP2R1A | + | | | | | | + |
| PPP2R4 | | | | | | | |
| PROC | | | | | | | |
| PRSS25/HTRA2 | | | | | | | |
| SDC1 | | | | | | | |
| SPINT2 | ++ | | | | | | |
| TAPBP | + | | | | | | |
| TM4SF1 | | | | | | | |
| UNC84B | | | | | | | |
| UNG | | | | | | | |
| ATF3 | | | | | | | |
| BCKD/BCKDK | | | | | | | |
| CCL2 | | | | | | | |

Fortsetzung Tabelle 50: Evaluation der funktionellen Assays. Zusammenfassung der im parallelisierten Verfahren ermittelten Effekte bezüglich der zellulären Funktionen Apoptose und Proliferation, analysiert mit 3 verschiedenen Antikörpern in den Zelllinien HEK-293 und PANC-1.

| Gen | Apoptose | | | Proliferation | | | |
|-----------------|---------------|--------|--------|---------------|--------|----------------|--------|
| | Caspase-Assay | | | Ki67-Assay | | CyclinB1-Assay | |
| | HEK-293 | PANC-1 | S2-007 | HEK-293 | PANC-1 | HEK-293 | PANC-1 |
| DUSP1 | | | | | | | |
| EBI2 | + | | | | | | |
| EDG6 | | | | | | | |
| FRA-2, FOSL2 | ++ | ++ | ++ | | | | |
| GTF2F2 | + | | | | | | |
| PTPN2 | | | | | | | + |
| STK12/AURKB | | | | | | | |
| ZNF22 | | | | | | | + |
| AGR2 | | | | | | | |
| C8orf20/REEP4 | | | | | | | + |
| CDC37 | | | | | | | |
| CST3 | | | | | | | |
| CYP4F12 | | | | | | | |
| FOXA3 | | | | | | | |
| IFI27 | | | | | | | |
| IL13RA1 | | | | | | | |
| LGALS4 | + | | | | | | + |
| PLAC8 | | | | | | | |
| POLR3K | | | | | | | |
| RAB34 | | | | | | | |
| RABAC1 | + | ++ | | | | | |
| S100P | | | | | | | |
| SQLE | | | | | | | |
| TFF1 | | | | | | | |
| BCL-10 | | | | | | | |
| BIRC5 | | | | | | | |
| CCND1 | | | | | | | |
| CLDN4 | | | | | | | |
| KCMF1 | | | | | | | |
| MMP2 | | | | | | | |
| PAI-1/ SERPINE1 | | | | | | | |
| Rab20 | | | | | | | |
| Smac/DIABLO | | | | | | | |
| TGFBR1 (c.a.) | | | | | | | |
| TGFBR2 (d.n.) | | | | | | | |
| TIMP2 | | | | | | | |
| XIAP/BIRC4 | | | | | | | |

Tabelle 51: Evaluation der funktionellen Assays.
Zusammenfassung der im parallelisierten Verfahren ermittelten Effekte bezüglich der zellulären Funktionen Differenzierung und epithelial-mesenchymale Transition, analysiert mit 2 verschiedenen Antikörpern in den Zelllinien HEK-293 und PANC-1.

| Gen | Differenzierung | | | |
|--------------------|-----------------|--------|------------------|--------|
| | Vimentin-Assay | | E-Cadherin-Assay | |
| | HEK-293 | PANC-1 | HEK-293 | PANC-1 |
| ADRBK1 | | | | |
| AMF / GPI | | | | |
| AMFR | | | | |
| Amplaxin / CTTN | | | | |
| ANXA2 / Lipocortin | | | | |
| BAX | | | | |
| CCL14 | | | | |
| CFL1 | | | | |
| CLDN7 | | | | |
| CNK/CNKSR1 | | | | |
| CNR2 | | | | |
| COPEB/KLF6 | | | | |
| CPNE1 | | | | |
| CRABP1 | | | | |
| CTSE | | | | |
| DDR1 | | | | |
| EDNRA | | | | |
| ELF3 | | | | |
| FASTK | | | | |
| G2AN/GANAB | | | | |
| GSPT1 | | | | |
| H1F0 | | | | |
| LGALS3 | | | | |
| MAP3K11 | | | | |
| MARVELD1 | | | | |
| NFATC1 | | | | |
| NKX2-5 | | | | |
| PCTK1 | | | | |
| PPM1G | | | | |
| PPP2R1A | | | | ++ |
| PPP2R4 | | | | |
| PROC | | | | |
| PRSS25/HTRA2 | | | | |
| SDC1 | | | | |
| SPINT2 | | | | |
| TAPBP | | | | |
| TM4SF1 | | | | |
| UNC84B | | | | |
| UNG | | | | |
| ATF3 | | | | |
| BCKD/BCKDK | | | | |
| CCL2 | | | | |
| DUSP1 | | | | |
| EBI2 | | | | |

Fortsetzung Tabelle 51: Evaluation der funktionellen Assays.

Zusammenfassung der im parallelisierten Verfahren ermittelten Effekte bezüglich der zellulären Funktionen Differenzierung und epithelial-mesenchymale Transition, analysiert mit 2 verschiedenen Antikörpern in den Zelllinien HEK-293 und PANC-1.

| Gen | Differenzierung | | | |
|-----------------|-----------------|--------|------------------|--------|
| | Vimentin-Assay | | E-Cadherin-Assay | |
| | HEK-293 | PANC-1 | HEK-293 | PANC-1 |
| EDG6 | | | | |
| FRA-2, FOSL2 | | | | |
| GTF2F2 | | | | |
| PTPN2 | | | | |
| STK12/AURKB | | | | |
| ZNF22 | | | | |
| AGR2 | | | | |
| C8orf20/REEP4 | | | | |
| CDC37 | | | | |
| CST3 | | | | |
| CYP4F12 | | | | |
| FOXA3 | | | | |
| IFI27 | | | | + |
| IL13RA1 | | | | |
| LGALS4 | | | | |
| PLAC8 | | | | |
| POLR3K | | | | |
| RAB34 | | | | |
| RABAC1 | | | | |
| S100P | | | | |
| SQLE | | | | |
| TFF1 | | | | |
| BCL-10 | | | | |
| BIRC5 | | | | |
| CCND1 | | | | |
| CLDN4 | | | | |
| KCMF1 | | | | |
| MMP2 | | | | |
| PAI-1/ SERPINE1 | | | | |
| Rab20 | | | | |
| Smac/DIABLO | | | | |
| TGFB1 (c.a.) | | | | |
| TGFB2 (d.n.) | | | | |
| TIMP2 | | | | |
| XIAP/BIRC4 | | | | |

7.3 EINZELCHARAKTERISIERUNG VON CFL1

7.3.1 Durchflusszytometrische Analysen

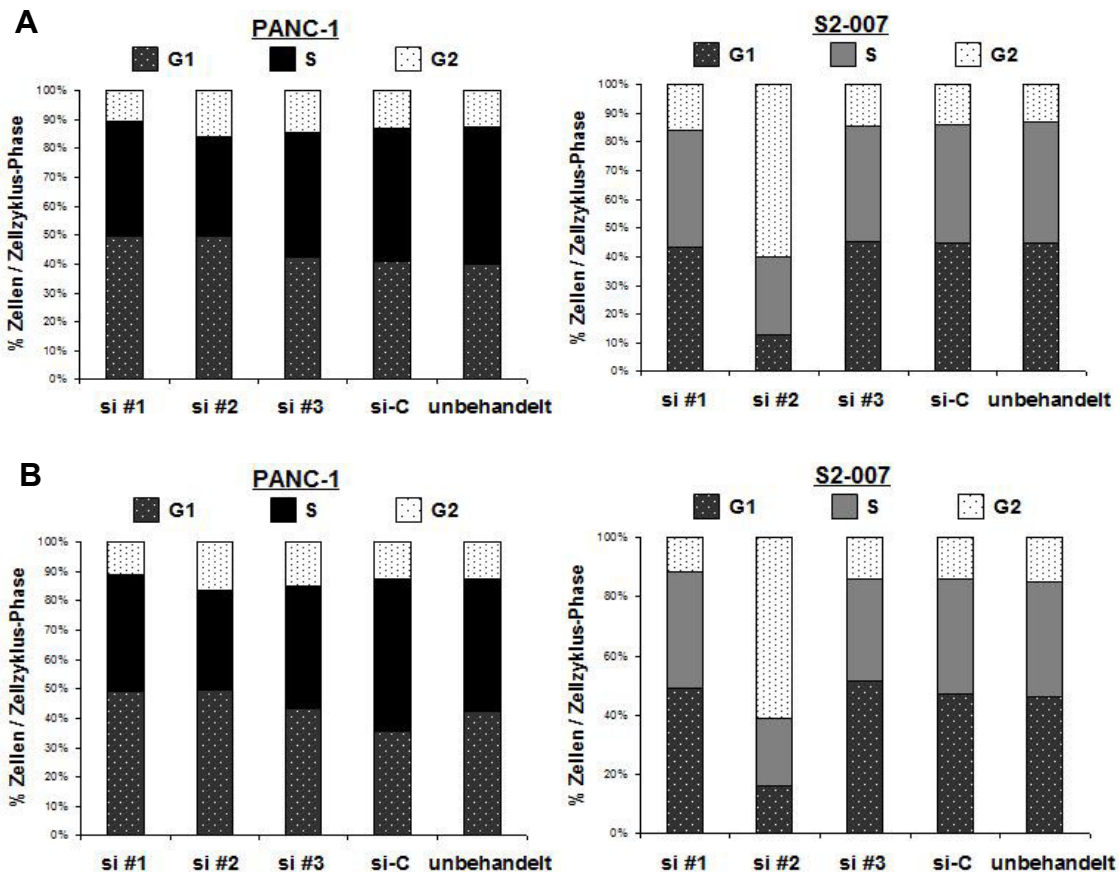


Abbildung 38: Analyse des Zellzyklus mittels Durchfluss-Zytometrie. Die Graphen zeigen die Ergebnisse der Einzelversuche für PANC-1- sowie S2-007-Zellen. Die Repression von CFL1 führte in PANC-1-Zellen zu einer reduzierten Anzahl an Zellen, die sich in der S-Phase befinden. Auch in S2-007-Zellen zeigte sich eine Reduktion der Zellen in der S-Phase. Außerdem konnte für siRNA #2 ein deutlicher G2/M-Phasen-Arrest beobachtet werden. **A:** unabhängige Versuchsreihe 2; **B:** unabhängige Versuchsreihe 3

si #1,2,3 = siRNA 1-3; si-C = „Non-silencing“-Kontrolle.

7.4 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren an der TU Kaiserslautern Brüne, Cullum, Deitmer, Friauf, Güttinger, Hahn, Hakenbeck, Krüger, Neuhaus, Trommer und an der Georg-August-Universität Göttingen Eberle, Fichtel, Fischer, Großkopf, Hagmayer, Hammerschmidt, Herrmann, Heymann, Hummel, Kappeler, Lass, Mattler, Paul, Rothe, Schauermann, Trocke, Waldmann, Wiesemüller, Yan, Zinner.

7.5 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Prof. Dr. Thomas Gress für die Möglichkeit, diese Dissertation in der Abteilung Gastroenterologie anzufertigen.

Dr. Malte Buchholz möchte ich herzlich danken für die Gelegenheit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, sowie für die gute Betreuung während der gesamten Zeit. Außerdem möchte ich mich für das vermittelte Wissen, die vielen Anregungen sowie die konstruktive Kritik bedanken, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Nicht zuletzt danke ich auch für die Hilfestellung bei der Anfertigung dieses Manuskripts.

Ich bedanke mich außerdem bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe, nämlich Tatjana Honstein, Brajesh Kaistha, Danny Schumacher, Anja Krattenmacher, Ying Chen, Johannes Huth, sowie bei der Professorin Brigitte Lankat-Buttgereit für den freundlichen Laboralltag und die kompetente Hilfe.

Auch den Mitarbeitern Elisabeth Bothe, Heidi Griesmann, Nada Milosevic, Eva Bug, Jan Riedel und Steffi Ripka möchte ich für die angenehme Labor- und Pausenatmosphäre danken. Des Weiteren möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des Forschungsbereichs 3 für die nette Zusammenarbeit bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt Harald Schmidt, Lisa Fiedler und Melanie Sauer. Harald danke ich dafür, dass er mit mir all sein weises Wissen geteilt hat und mich perfekt in die Zellkultur und in die Kunst des Western Blots eingearbeitet hat. Lisa hatte nicht weniger gute Tipps und Tricks auf Lager. Außerdem danke ich ihr für die fachkundige Einführung in die hessischen Brauchtümer und die Aufklärung darüber, dass heißer Apfelwein besser schmeckt als kalter. Meli danke ich dafür, dass sie mir endlich beigebracht hat, wie man mit „mol“ rechnet. Alle Drei und die vielen gemeinsamen Unternehmungen haben dazu beigetragen, dass ich mich in Marburg auch privat sehr wohlfühlt habe.

Meine liebe Ramona! Ich danke dir von Herzen für die tolle Zeit im „Spaßlabor 4311“. Als blutige Anfänger haben wir vor über 4 Jahren gemeinsam angefangen. Danke für

die immer schöne und vor allem lustige Zeit und für die viele Arbeit, die du mit mir geteilt hast. Du hattest immer ein offenes Ohr sowohl für berufliches als auch privates und bist nicht nur meine Laborpartnerin sondern auch Freundin geworden. Ich hoffe sehr, dass wir uns nicht aus den Augen verlieren und wir noch in 10 Jahren zusammen lachen! Danke auch dafür, dass du meinen Musikgeschmack verbessert und meinen Dialekt nachhaltig beeinflusst hast („Fisch“).

Meinen Eltern danke ich von Herzen für die liebevolle Unterstützung, die sie mir auch während der Zeit meiner Dissertation jederzeit haben zukommen lassen und für die Tatsache, dass sie mich bei all meinen Plänen immer bedingungslos unterstützen.

Mein allergrößter Dank gilt meinem Freund Björn Kirchhoff, der mich bedingungslos bei dieser Dissertation unterstützt hat. Danke dafür, dass du mich immer wieder aufgebaut und mir auch in schwierigeren Zeiten beigestanden hast. Dein gnadenloser Optimismus und dein Glauben an mich haben mich durch die 4 Jahre getragen. Danke für deine Liebe und dass du mich immer wieder erdest, wenn ich die Nerven verliere. Du bist meine Sonne.